



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

**L-ARGININA E ÍNDICE ARGININA/CITRULINA COMO
MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DISFUNCIÓN DE
ACTIVIDAD DE LA OXIDO NÍTRICO SINTASA
ENDOTELIAL, EN PACIENTES CON HEMORRAGIA
SUBARACNOIDEA ANEURISMÁTICA Y ASOCIACIÓN
CON EL GEN POLIMORFICO 27 VNTR**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN NEUROCIRUGÍA

P R E S E N T A :
JUAN BARGES COLL

ASESORES DE TESIS: DR. CAMILO RÍOS
DEPARTAMENTO DE NEUROQUÍMICA
DR. JUAN LUIS GÓMEZ AMADOR
DEPARTAMENTO DE NEUROCIRUGÍA



MÉXICO, D.F.

2008



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.

DR. RICARDO COLIN PIANA
Dirección de Enseñanza
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

DR. SERGIO GOMEZ LLATA ANDRADE
Subdirección de Neurocirugía
Profesor Titular del Curso

DR. CAMILO RIOS
Departamento de Neuroquímica
Asesor de Tesis

DR. JUAN LUIS GOMEZ AMADOR
Médico Adscrito a la Subdirección de Neurocirugía
Asesor de Tesis

Coautores

Iván Pérez Neri PhD.

Departamento de Neuroquímica
INNN.

Aurelio Jara Prado PhD

Departamento de Genética
INNN.

Sebastián López Cuesta

Departamento de Neurocirugía
INNN

Javier Avendaño Méndez-Padilla

Departamento de Neurocirugía
INNN

Nelson Novarro Escudero

Departamento de Neurología

A mis maestros

Dr. Rogelio Revuelta Gutiérrez y Dr. Sergio Gómez Llata Andrade
por su dedicación y esfuerzo a nuestra formación como neurocirujanos.

A Juan Luís Gómez Amador, por la confianza y
enseñanza pero sobre todo por tu amistad.

A mis Padres, Juan Antonio y Nuria eternos compañeros de este viaje, gracias por su entrega, cariño y esfuerzo, son ustedes objeto de mi más grande admiración y cariño.

A Itzel Vela. Gracias por el amor, apoyo y comprensión pero sobre todo por ser el motivo para seguir adelante, por lo que somos y lo que viene.

A Nuria, Pablo, Jaime y próximamente Sofía o Sebastián.

Mi familia Panameña, esta va por ustedes.

Emilio, Manuel, Mario, Uri, Chabela, Peter, Piru, Felipe por hacer que los momentos difíciles pasen rápido y que los momentos felices sean imposibles de olvidar. Salud!

INDICE

1.- Abstract/Resumen	
2.- Antecedentes	11
3.- Marco Teórico	14
4.- Objetivos	22
5.- Hipótesis	22
6.- Material y Métodos	22
6.1 Criterios de Inclusión, exclusión y parámetros del Estudio.	
6.2 Definición de Variables	
6.3 Algoritmo Metodológico	
7.- Resultados	32
8.- Discusión	51
9.- Conclusiones	55
10.- Bibliografía	56

ABSTRACT

Background

Subarachnoid hemorrhage (SAH) resulting from ruptured cerebral aneurysms is a neurological event with significant consequences, the incidence of ruptured cerebral aneurysms ranges from 6 – 21 per 100,000 depending on the population analyzed.(5,11)

Multiple experimental articles have demonstrated that nitric oxide levels are decreased after subarachnoid hemorrhage, due to toxicity of oxyhemoglobin to neurons containing neuronal nitric oxide synthase in the adventitia of the artery, endogenous inhibition of endothelial NOS and scavenging of nitric oxide by oxihemoglobin released from subarachnoid clot.

Clinical application of these findings has been limited, in this research we try to describe the physiopathology of the endothelial NOS activity after a subarachnoid hemorrhage, and propose the direct precursor of Nitric Oxide , L/Arginine as a biological marker of severity.

Methods

We conducted a prospective cohort blinded study approved by our institution review board, inclusion criteria, that is , where admitted in the first 24 hours of the hemorrhage, not coming from a different hospital, had nothing PO on the previous 8 hours have not taken any medication on the past 8 hours and wished to participate, had Hunt and Hess classification 1 or 2 or WFNS 1 or 2, and gave informed consent. Data pertaining to demographics, comorbidites admission Glasgow coma Scale and Hunt and Hess scale were recorded at the moment the patient was admitted to the emergency department under the suspected diagnosis of ruptured aneurysm. We used multinomial regression (proportional odds) to show the relationship between L-Arginine and index L-Arginine/Citrulline and outcome at discharge which was graded according to Glasgow outcome scale.

We screened for two-way interactions, which are reported when present. Results with $p < .05$ were considered significant. Statistical calculations were made with standard commercial software (SPSS vs. 16).

Results

The L-Arginine levels had a mean of 74.02 $\mu\text{m}/\text{dl}$, SD 70.411 minimum of 24.97 and a max level of 412.55. The citrulline levels where as follows, minimum of 10.95 maximum of 60.15 and a mean of 27.66 with a SD of 8.45. ROC curves were constructed to illustrate the ability of the L-Arginine to predict independently a poor outcome. The level at which L-Arginine was able to have the highest sensibility was 100.02. with a sensibility of 74% to detect patients that where graded as GOS 1 and 2. The logistic regression model resulted in Arginine as $\exp(b)$ of 70/1 for a bad outcome graded as s Glasgow outcome scale.

Conclusions

The disruption of the L-Arginine -NOS - L-Citrulline is clearly involved in the pathogenesis of SAH, and levels of L-Arginine above 100 μm are considered to have a 70 fold probability of death or vegetative state.

Antecedentes

La falla en la producción-regulación de la vía del ON provoca varias alteraciones que pudieran explicar adecuadamente los eventos patológicos que suceden en los pacientes con HSA, esto puede explicarse por inhibición de la Oxido Nítrico sintasa, este mecanismo ha sido propuesto por varios autores y demostrado a nivel experimental, con esto tendríamos niveles elevados de L-Arginina y niveles bajos de L-Citrulina para, con la consecuente incapacidad para la regulación del tono vascular, mayor agregación plaquetaria que pudiera explicar los microembolismos demostrados en los pacientes con HSA y la disfunción endotelial que opera en todos estos pacientes en menor o mayor medida

Material y Métodos

Se realizó un estudio prospectivo, que involucró 37 pacientes que acudieron al servicio de Urgencias del INNN entre Julio 2006 y Noviembre 2007 con diagnóstico de Hemorragia subaracnoidea aneurismática y que cumplieron con los criterios de inclusión, ayuno, primeras 24hrs del ictus vascular, escala de Hunt y Hess I o II o de la Federación Mundial de Cirugía Neurológica de I o II (pacientes que se consideraría por este criterio tienen buen pronóstico).

El trabajo incluyó dos brazos de investigación, el primero la determinación de los niveles de Arginina y Citrulina para estudiar los cambios que ocurren a nivel de la producción - regulación de la formación de Oxido Nítrico y su utilidad como marcadores de severidad en pacientes con buen grado neurológico al ingreso y el segundo brazo es el de evaluar si existen polimorfismos en el gen que codifica para la Oxido Nítrico Sintasa endotelial que expliquen las diferentes respuestas en cada paciente.

Resultados

Mediante el análisis multivariado entre los niveles de Arginina en el tercer y cuarto cuartil y mediante la construcción de una curva de ROC, Se compararon los niveles de arginina contra los pacientes que presentaron estados neurológicos pobres (Estado Vegetativo y Muerte) encontrándose una asociación estadísticamente significativa con una $P < 0.05$, que se corroboró mediante regresión logística,

Conclusiones

El aumento en los niveles de L-Arginina por arriba de $100.2 \mu\text{M}$, se traduce en un paciente tiene 70 veces mas posibilidades de muerte que los pacientes con niveles bajos de L-Arginina, La presencia de L-Arginina elevada entonces nos lleva a pensar en toda la vía metabólica intracelular de este aminoácido durante su proceso hasta la activación de la forma inducible de la oxido nítrico sintasa.

3.- MARCO TEORICO

Los Eventos vasculares cerebrales son una de las principales causas de mortalidad y la principal causa de discapacidad dentro de las enfermedades neurológicas. La hemorragia subaracnoidea comprende aproximadamente entre el 6 y 8% de los eventos vasculares cerebrales y aproximadamente el 50% tiene un desenlace fatal.(11) Se calcula que existe una prevalencia de entre 7 y 20 personas por cada 100,000 habitantes que cursan con una malformación del tipo aneurismática. A pesar de un gran avance en el tratamiento y diagnóstico de la hemorragia subaracnoidea el pronóstico sigue siendo muy pobre.(1,11,2)

El vasoespasmo cerebral tardío (VCT) se define como una forma de vasoconstricción que reduce de manera importante el flujo cerebral y que sucede típicamente posterior a una hemorragia subaracnoidea, muchas veces secundaria a ruptura aneurismática. El vasoespasmo cerebral tardío se desarrolla hasta en un 70% de los casos de hemorragia subaracnoidea y provoca hasta en un 36% manifestaciones clínicas. A pesar del tratamiento actual el 50% de los pacientes con vasoespasmo sintomático desarrollaran un evento vascular isquémico. (11)

Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado y sin embargo su fisiopatología aun se mantiene poco entendida. Se ha propuesto que el mecanismo de vasoconstricción es multifactorial, sin embargo los **procesos inflamatorios** se perfilan como uno de los candidatos mas importantes en la fisiopatología de esta complicación, como se comenta mas adelante.

El diagnóstico del vasoespasmo cerebral tardío muchas veces se hace cuando los pacientes presentan manifestaciones clínicas. Hasta ahora el doppler transcraneal es el único método para detectar el vasoespasmo asintomático, sin embargo el tiempo que transcurre entre la detección del vasoespasmo por doppler

transcraneal y las manifestaciones clínicas es muy corto dejando una ventana terapéutica muy pobre. (4,5)

Los cambios asociados al vasoespasmo cerebral tardío han sido descritos ampliamente y se conocen dos fases : vasoconstricción seguida de proliferación de la intima de los vasos sanguíneos. La vasoconstricción ocurre de manera clásica 72hrs posteriores a la exposición a la hemoglobina , y se asocia a la aparición de varias sustancias vasoactivas.

La vasoconstricción provoca distorsión de las células endoteliales, aumentando la permeabilidad endotelial, la expresión de las moléculas de adhesión celular , infiltración leucocitaria a la intima , expresión de moléculas de adhesión plaquetaria, entre otros fenómenos. La IgG y el sistema del complemento se han estudiado también en el desarrollo del vasoespasmo; en algunos estudios se han encontrado niveles elevados de esta inmunoglobulina, además de bandas oligoclonales tanto en suero como liquido cefalorraquídeo apoyando la teoría del proceso inflamatorio como principal mecanismo en la fisiopatología del desarrollo del vasoespasmo.(11)

En un estudio reciente se demostró que el factor de Von Willebrand (vWF) y el factor de crecimiento endotelial se encuentran elevados en pacientes con HSA hasta tres días antes del desarrollo de vasoespasmo.(14)

El factor de crecimiento endotelial se ha sugerido como precursor de los cambios iniciales del vasoespasmo en la vasculatura general y se ha observado un aumento en los niveles de este factor posterior a daño endotelial. El factor de crecimiento endotelial estimula la proliferación celular, provoca aumento de la permeabilidad endotelial facilita la migración de las células del músculo liso además de aumentar los niveles en la expresión de las moléculas de adhesión. (11,14)

Otra de las áreas de mayor investigación en cuanto a la fisiopatología del VCT, es la disminución de la concentración del Oxido Nítrico (ON), además de la liberación y producción de radicales libres como el propio ON.

El oxido nítrico es producido en las células endoteliales, neuronas, glia y macrófagos por tres isoformas de la NOS. (6)

El Oxido nítrico es un potente vasodilatador, además de un inhibidor importante de la activación plaquetaria, proliferación de las células del músculo liso y apoptosis de las células endoteliales.

La unión de la oxihemoglobina al ON es uno de los mecanismos asociados a la disminución de la concentración de esta molécula posterior a la HSA. En estudios previos se ha mostrado que el aumento mediante donadores de ON y reguladores de la actividad de la Oxido Nítrico Sintasa (eNOS) mejora de manera importante el vasoespasmo en los modelos experimentales.(6,11)

La homeostasis vascular es dependiente del balance entre sustancias vasoconstrictoras como la endotelina 1 y sustancias vasodilatadores como el Oxido Nítrico, como se menciono anteriormente el Oxido nítrico se une de manera ávida a la hemoglobina y por tanto disminuye su actividad con la consecuente disfunción endotelial, agregación plaquetaria y alteraciones en el tono vascular.(15)

El oxido nítrico es un segundo mensajero que puede ser sintetizado en el sistema nervioso por tres distintas isoformas de una enzima, la ON sintasa neuronal, (nNOS), la oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la forma inducible de la oxido nítrico sintasa (iNOS).¹ eNOS y nNOS son similares, la forma inducible difiere de estas dos ultimas en que esta se encuentra regulada principalmente por procesos inflamatorios y su actividad se ve aumentada mediante los mismos mediadores químicos que se generan ante cualquier situación de estrés. Sin embargo hay varias situaciones especificas que comentar y entender: la iNOS es

¹ Lee J, Ryu Hoon, Ferrante R. Translational control of iNOS expressin by arginine can explain the arginine paradox. PNAS April 100(8) 2003.

capaz de producir grandes cantidades de ON en situaciones específicas, sin embargo la activación persistente de iNOS puede genera niveles tóxicos de ON provocando oxidación de proteínas y lípidos. La producción excesiva de ON mediante iNOS ha sido implicada ya en diferentes procesos como son, enfermedad de Parkinson, demencias, Enfermedad de Alzheimer, eventos vasculares cerebrales diferentes a la hemorragia subaracnoidea y la esclerosis lateral amiotrofica. Esta asociación con distintas enfermedades ha provocado que los estudios al respecto aumenten exponencialmente.[•] En respuesta a estímulos inflamatorios como puede ser la hemorragia subaracnoidea la arginina (L-Arginina) es transportada a la célula (incluyendo la microglia) mediante transportadores específicos. Sin embargo a pesar de encontrarse en concentraciones elevadas, es necesario el transporte de L-arginina para la activación de iNOS, es decir a pesar de encontrarse L-Arginina en concentraciones que deberían saturar a la enzima, esta requiere de la transportación de L-Arginina para activarse. Este fenómeno se conoce como la paradoja de la arginina.(15)

Los factores genéticos parecen ser de gran importancia en la patogénesis de la enfermedad cerebro vascular, pero las bases moleculares para esta predisposición genética se desconocen. En muy pocos pacientes con causas raras de EVC, frecuentemente secundarias a alteraciones metabólicas y de coagulación, se conoce alguna anormalidad genética; sin embargo, en la mayoría de los pacientes las bases genéticas parecen ser poligénicas, actuando de manera independiente o por efectos que son influenciados o que predisponen, conocidos como factores de riesgo, tales como la hipertensión (21).

La producción del Oxido Nítrico esta regulada por múltiples mecanismos y de igual forma los procesos mórbidos como puede ser la hemorragia subaracnoidea pueden provocar alteraciones en la producción de dicha molécula. De acuerdo

[•] Fischer G. 1985. Cell Res. 159. 273-279

con algunos estudios que se revisaron, la producción y disponibilidad de L-Arginina se pensaba actuaba directamente proporcional a la producción de Oxido Nítrico mediante la enzima Oxido Nítrico Sintasa, hoy en día se conoce que esto no es del todo real.

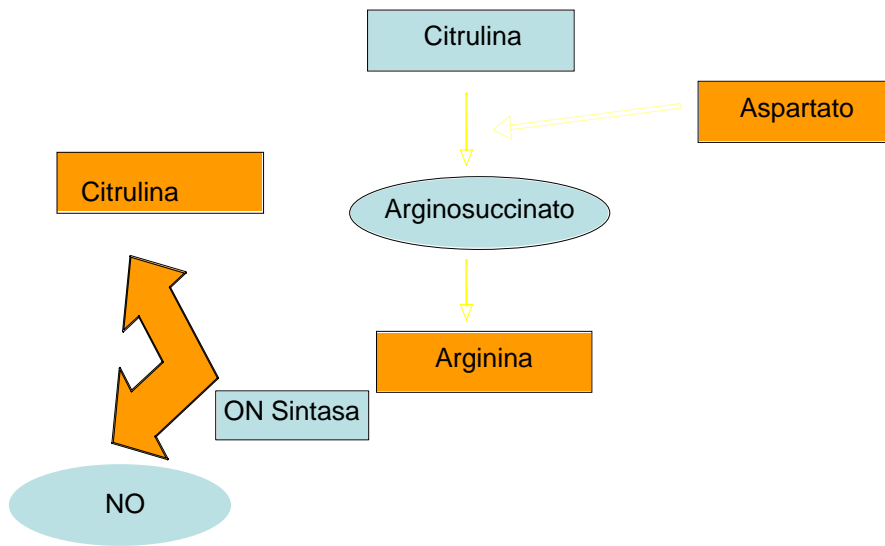
Existen múltiples publicaciones en las cuales los derivados metilados de la L-Arginina como la di-metilarginina asimétrica (ADMA) se asocia con mal pronóstico en pacientes con enfermedad cardiovascular con un mal pronóstico. Desafortunadamente en enfermedad cerebro vascular y en específico en cuanto a hemorragia subaracnoidea, la literatura es muy pobre.

La arginina es el único sustrato conocido para la producción de Oxido Nítrico (ON), en el sistema nervioso el ON participa en múltiples procesos y actúa en respuesta a estímulos nocivos pero igualmente en exceso puede provocar afección.

La Arginina está clasificada como un aminoácido semiesencial, esto se alude a la necesidad de tomar la arginina de la dieta durante el desarrollo, sin embargo durante periodos de enfermedad o estrés metabólico como puede ser una respuesta inflamatoria sistémica aumenta la síntesis de arginina. El presente trabajo parte de la base que durante un episodio de hemorragia subaracnoidea, existe una respuesta inflamatoria sistémica como ocurre en cualquier episodio en que el endotelio responde a una agresión, en este sentido podemos suponer que existe una mayor producción de arginina que será de forma directamente proporcional a la magnitud de la respuesta inflamatoria sistémica. La síntesis *de novo* de arginina requiere del metabolismo y transporte de citrulina este aminoácido se sintetiza en el ciclo de la urea a partir de la Ornitina.

•Figura 1

• En el esquema observamos de forma muy resumida la producción de ON a partir de Arginina, nuestro target en el presente trabajo será precisamente obtener los niveles de Arginina y Citrulina.



La arginina es el sustrato de todas las isoformas de Oxido Nítrico Sintasa y algunos

análogos de la L-Arginina son potentes inhibidores de la misma, en este contexto debemos pensar que la biodisponibilidad de L Arginina es necesaria para la síntesis de ON pero su acumulacion puede resultar de procesos patológicos como el que estudiamos en este trabajo, la hemorragia subaracnoidea.

El endotelio juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Como ya mencionamos en este trabajo el oxido nítrico es fundamental para mantener el equilibrio entre flujo sanguíneo y tono vascular. La disfunción en la vía L-Arginina-Oxido Nítrico, provoca alteraciones cardiovasculares que han sido ampliamente descritas en la literatura, en este trabajo nos enfocaremos en las alteraciones provocadas a nivel endotelial y la inflamación vascular que esta disfunción puede provocar.

La Paradoja de la L-Arginina consiste en la estimulación de la síntesis del ON al aumentar la concentración extracelular de L-Arginina a pesar de que a nivel intracelular dicho aminoácido se encuentra en concentración suficiente para saturar a la NOS. En estudios experimentales se ha demostrado que el

suplemento de L-Arginina en conejos inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión monocitaria y reduce la proliferación de músculo liso a nivel de los vasos sanguíneos. Sin embargo los estudios in vitro, contrastan de forma importante con los estudios in vivo provocando el efecto contrario (24)

NOS es incapaz de utilizar ADMA como sustrato para la producción de ON. ADMA inhibe la actividad de la NOS y puede ser perjudicial como se ha demostrado en estudios con respecto a enfermedad cardiovascular. A la fecha no existe ningún estudio en humanos que busque un marcador bioquímico de la producción del óxido nítrico para la determinación de la severidad de los pacientes.

A la fecha se conocen otros inhibidores de la enzima responsable de la producción del Óxido Nítrico, entre ellos están derivados metilados de la L-Arginina sin embargo hasta ahora el más potente inhibidor de la forma inducible de la Óxido Nítrico Sintasa es precisamente ADMA (25) en el presente trabajo intentaremos describir que ocurre en estos pacientes a nivel bioquímico con respecto a la producción del Óxido Nítrico, y tratar de aplicarlo en la clínica como marcador de severidad en pacientes con diagnóstico de Hemorragia subaracnoida grado I o II de la escala de Hunt y Hess.

Existen varios genes que se encuentran relacionados con el sistema endotelial, entre ellos el que codifica para la sintasa del óxido nítrico endotelial (SONe) encargada de la formación de óxido nítrico (NO) a partir de la L-arginina (19). El interés por esta enzima ha crecido enormemente por presentar polimorfismos considerados factores de riesgo para el desarrollo de hemorragia subaracnoidea y vasoespasmismo cerebral (20), enfermedad cerebrovascular isquémica (21), infarto lacunar (19).

Se ha reportado un polimorfismo en el exón 7 del gen de la NOS endotelial como un fuerte factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad arterial coronaria, es una transición en la posición 894 del gen que cambia una guanina por una citosina (G894T), este polimorfismo da como resultado el cambio del aminoácido glutamina por el aminoácido aspártico (21).

Otro polimorfismo en la región 5' del gen de la SON es la transición T786C que cambia una timina por una citosina afectando la expresión de la SON endotelial y resultando en una disminución en la producción de óxido nítrico, ha sido implicado en el espasmo coronario en japoneses (18).

En otro estudio realizado por Wang, examinó la frecuencia de un repetido en tandem de número variable (VNTR) de 4 o 5 repetidos de 27 pares de bases denominados 4b/4a respectivamente en el intrón 4 del gen de la SON endotelial, encontrando una asociación positiva entre el polimorfismo 4a y el riesgo de enfermedad arterial coronaria dependiente del tabaquismo. (23).

Existen varias razones para enfocar el estudio de los polimorfismos de la SONE en enfermedades vasculares. Primero, el óxido nítrico derivado de las formas constitutivas de la sintasa del óxido nítrico actúa como un potente vasodilatador e inhibidor de la inflamación, de la proliferación celular de músculo liso y de la agregación plaquetaria (22). Segundo, hay evidencias bioquímicas, inmunohistoquímicas y funcionales en donde se demuestra una alteración en señalización del NO después de una hemorragia subaracnoídea experimental en animales y una alteración en la capacidad de producción de NO en líquido cerebroespinal en humanos después de una hemorragia subaracnoídea (20). Tercero, la sobre expresión en animales de la SON ha mostrado tener un efecto vaso protector. Cuarto, los animales Knockout de la SONE desarrollan hipertensión, enfermedad arterial coronaria, y formación aneurísmica aórtica. Quinto, La isoforma inducible de la SON y una disminución en la actividad de la

SON endotelial pueden generar radicales libres afectando la estructura y función de las paredes de los vasos sanguíneos (20).

El conocimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo del vasoespasmo puede dirigirnos hacia mejores y nuevas terapias que ayuden a mejorar el pronóstico de los pacientes. Recientemente se han intentado nuevas formas medicas para el tratamiento de estos pacientes, sin embargo aun esta pendiente entender de mejor forma la participación del oxido nítrico en la disfunción endotelial que sufren estos pacientes para tener nuevos targets terapeuticos.

JUSTIFICACION

Recientemente se han intentado nuevas formas medicas para el tratamiento de estos pacientes, sin embargo aun esta pendiente entender de mejor forma la participación del oxido nítrico en la disfunción endotelial que sufren estos pacientes para tener nuevos targets terapeuticos.

Las clasificaciones actuales que usualmente se usan en Neurocirugía como marcadores de severidad, morta y morbilidad tienen un valor predictivo negativo muy pobre con una especificidad baja, y de forma bioquímica no se ha encontrado un marcador que tenga una adecuada correlación con el pronostico del paciente.

4.- OBJETIVOS

- Analizar los niveles plasmáticos de Arginina y citrulina comparativamente con las escalas de enfermedad vascular cerebral.(GOS , Rankin)
- Evaluar la utilidad del análisis al ingreso de los niveles de L-Arginina, Citrulina y el Índice L-Arginina/Citrulina en plasma como factor de mal pronóstico en pacientes con diagnóstico de Hemorragia subaracnoidea aneurismática.
- Evaluar la presencia de polimorfismos genéticos de la enzima oxido nítrico sintasa **endotelial**.

5.- HIPOTESIS

H1 : Los niveles plasmáticos de L-Arginina y citrulina se asocian con la severidad del vasoespasmo y a la escala de Glasgow de salida (GOS)

Ho : Los niveles de actividad de Oxido nítrico sintasa, medidos de forma indirecta mediante la determinación de l- arginina y citrulina no se modificaran con respecto a la severidad y a la aparición de vasoespasmo.

6.- MATERIAL Y METODOS

Universo del estudio

Se calculo una muestra de 32 pacientes de acuerdo a la prevalencia de la enfermedad en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Se incluyeron los pacientes mayores de 17 años, que cumplieran con los demás criterios de inclusión del protocolo, de ambos sexos y con diagnostico de Hemorragia subaracnoidea de etiología aneurismática.

El trabajo se llevo a cabo en las instalaciones del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en colaboración con los siguientes departamentos entre Julio 2006 y Noviembre 2007.

- Servicio de Neurocirugía.
- Servicio de Neurología.
- Terapia Intensiva Neurológica
- Departamento de Neuroquímica INNN.
- Departamento de Genética INNN.

Se realizo un estudio prospectivo, de cohorte. Se tomaron para el estudio todos los pacientes con diagnostico de hemorragia subaracnoidea que ingresaron al servicio de Urgencias del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía dentro de las primeras 24hrs posteriores al evento vascular, entre Julio del 2006 y Noviembre del 2007. Que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión:

- a) Firmar consentimiento informado.
- b) Edad 17 - 70 años.
- c) Llegar en las primeras 24hrs del ictus vascular.
- d) Ayuno de por lo menos 8 horas.
- e) Grado neurologico al ingreso HyH 1 o 2 y WFNS 1 o 2

- f) Diagnostico de Hemorragia subaracnoidea realizado mediante Tomografía simple y/o en su defecto mediante punción lumbar.
- g) Diagnostico de Aneurisma mediante angiografía por sustracción digital.
- h) No haber tomado medicamentos antiinflamatorios en las ultimas 8 horas.

Se realizo análisis estadístico mediante software SPSS version 16. Se utilizo estadística descriptiva y analítica para la evaluación de los resultados. El trabajo fue ciego tanto al evaluador clínico como para los departamentos de neuroquímica y genética.

Se realizo prueba de Chi cuadrada, y Mann-Whitney para determinar si existian asociaciones entre las variables L-arginina, Citrulina, con la escala de GOS y mortalidad, dias de estancia intrahospitalaria, edad , sexo. Se tomo como valor significativo una $P < 0.05$.

Se determino mediante la división de resultados en cuartiles de L- Arginina para comparar los resultados mas altos con la escala de Glasgow de Salida, se determino además mediante una curva de ROC, la sensibilidad mas alta a la cual una valor determinado pudiera predecir mortalidad.

Se realizo una regresión logística para corroborar de esa forma la capacidad de predecir mortalidad por la L-arginina como un factor independiente, se utilizo la glucosa en el análisis estadístico conociendo que esta como marcador bioquímica esta demostrado tiene una asociación como marcador de mal pronostico.

Se tomaron muestras de 20ml de sangre periférica a todos los pacientes que aceptaron ingresar al protocolo y que cumplieron con los criterios de inclusión del mismo, se almacenaron las muestras en tubos de ensayo con EDTA previamente rotulados mediante numeración seriada, las muestras fueron

llevadas al departamento de neuroquímica para la determinación de Arginina y Citrulina.

Procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre completa fueron centrifugadas a 3000 rpm y se separó el plasma, el cual se almacenó a -80°C hasta su análisis. Alícuotas de plasma fueron desproteinizadas con ácido perclórico, neutralizadas con carbonato de potasio y centrifugadas a 10000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes fueron colectados para el análisis de arginina y citrulina por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia.

Análisis cromatográfico

La cuantificación de arginina y citrulina se llevó a cabo por HPLC como ha sido reportado (16) con algunas modificaciones. Las muestras fueron derivatizadas con o-ftalaldehído/mercaptoetanol e inyectadas a una bomba cuaternaria Serie 1100 (Agilent Technologies). La elución se llevó a cabo en una columna Adsorbosphere OPA HS (100x4.6 mm, 5 µm diámetro de partícula, Alltech) utilizando como fase móvil un amortiguador de acetatos (AcO, 50 mM, pH 5.9), junto con tetrahidrofurano (THF) y metanol absoluto (MetOH) grado HPLC a una velocidad de flujo de 1.5 ml/min. El programa de solventes utilizado (27 min) constó de un periodo de elución isocrática (min 0-5) seguido de un gradiente lineal (min 5-27) como se describe a continuación: THF 1.0% 0-27 min; AcO 89% min 0-5, 89-77% min 5-27), MetOH 10% min 0-5, 10-22% min 5-27. Las señales fueron detectadas a longitudes de onda de excitación/emisión de 232/455 nm y se analizaron con un software ChemStation (Agilent Technologies).

Para la determinación de los polimorfismos genéticos se realizó el siguiente procedimiento :

Se amplificaron las regiones donde se encuentran los polimorfismos G894T, T786C y 4a/4a en el gen de la sintasa del óxido nítrico endotelial mediante PCR utilizando 100 ng de DNA y 100 ng de los siguientes primers:

Para genotipificación del polimorfismo G894T el primer forward 5'GCATTCAGCACGGCTGGA, y el primer reverse 5'GCTCCAGGGGCACCTCAA.

Para la genotipificación del polimorfismo T786C el primer forward 5'-TTTCTCCAGCCCCTCAGATG-3', y el primer reverse 5'- AGGCCCCAGC AAGGATGTAGT-3'.

Para la genotipificación del polimorfismo 4b/4a el primer forward 5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3' y el primer reverse 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3'.

Además 200 μ M de dNTPs, 10 mM tris-HCL pH 8.3, 1.5 mM de MgCl₂, 50 mM KCl, 1mg TRITON X-100/ml, 1 U de taq polimerasa en un volumen total de 100 μ l. Las condiciones de reacción fueron: 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°C seguido por 35 ciclos de 1 min a 93°C, 1 min a 59°C y 2 min a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de las reacciones para los polimorfismos T-786C se pusieron a digerir con las enzimas de restricción BanII y NgoMI respectivamente, posteriormente se analizarán en geles de poliacrilamida al 10% no desnaturalizante, para finalmente visualizar los polimorfismos con bromuro de etidio y luz ultravioleta. Por lo que respecta al polimorfismo 4b/4a, el producto de reacción de PCR se corrió en un gel de acrilamida al 10 % no desnaturalizante para posteriormente teñirlo con bromuro de etidio y visualizarlo en luz ultravioleta.

Manejo clínico

Todos los pacientes fueron manejados como lo marca el protocolo interno de manejo de pacientes con hemorragia subaracnoidea aneurismática del INNN.

Los pacientes fueron llevados ya sea a la unidad de cuidados intermedios o intensivos según sea el caso, recibieron 60mg de Nimodipino cada 4hrs como manejo profiláctico por posible vasoespasmos. Se manejaron con solución salina 0.9% a 1ml/kg/hr, además de rehomacrodex 500ml cada 24hrs hasta mantener POVC 12/14mmhg, Los pacientes fueron tratados mediante clipaje del aneurisma de forma temprana todos los pacientes fueron tratados en las primeras 24hrs de su ingreso a urgencias.

Los pacientes fueron evaluados mediante escalas convencionales de severidad como son la de la Federación Mundial de Cirugía neurológica, la escala de Hunt y Hess y la escala de Fisher. El seguimiento fue mediante escala de Glasgow de salida.

Todas las muestras sanguíneas fueron tomadas antes de iniciar cualquier tipo de manejo médico.

Criterios de exclusión

- a) No firmaron consentimiento informado.
- b) Menores de 17 años
- c) Pacientes con Intubación orotraqueal y ventilación mecánica asistida a su ingreso.
- d) Escala de Glasgow inicial igual o menor a 12.
- e) Hunt y Hess 3 o 4.

Criterios de eliminación.

- a) Pacientes referidos de otra institución y tratados previamente con cualquier medicamento o que no estuvieran en ayuno.
- b) Pacientes que solicitaron alta voluntaria.

PARAMETROS DEL ESTUDIO

1.- CLINICOS

- Escala de Fisher
- Escala de Hunt y Hess
- Escala de Barthel.
- Escala de Glasgow de salida.
- Escala de Rankin.

2.- NEURORADIOLOGICOS

- Tomografía computada de cráneo.
- Doppler transcraneal.
- Angiografía por sustracción digital.

3.- LABORATORIO

- Niveles en plasma de Arginina y Citrulina
- Biometría Hemática completa, Química sanguínea , TP y TPT.
- Determinación de polimorfismos genéticos de la eNOS.

RECURSOS

1.- HUMANOS

- Personal Medico de Neurocirugía.
- Personal Medico de Neurología.
- Departamento de Neuroquimica.
- Personal Medico de Neurorradiologia.
- Personal Medico de Terapia Endovascular.
- Personal de enfermería.

2.- FISICOS

- Área de Urgencias del INNN.
- Unidad de Neuroimagen.
- Quirófanos.
- Área de Neurocirugía.
- Área de Neurología.
- UTIM.
- UTI.
- Consulta Externa.

Independientes		Dependientes	
<i>Variable</i>	<i>Escala</i>	<i>Variable</i>	<i>Escala</i>
Edad	Cuantitativa discreta	Mortalidad	Nominal dicotomica
Sexo	Nominal dicotomica	GOS	Cualitativa Ordinal
HyH	Cualitativa Ordinal	Estancia Intrahospitalaria	Cuantitativa Discreta
Fisher	Cualitativa Ordinal	Vasoespasma	Nominal dicotomca
L-Arginina	Cuantitativa discreta	Morbilidad Mayor	Nominal Dicotomica
Citrulina	Cuantitativa discreta	GOS Cat	Nominal Dicotomica

Definición de variables

Vasoespasma : se determino _vasoespasma mediante el uso de Doppler transcraneal con índice de Lindergaard igual o superior a 3.

Vasoespasma sintomático : Se considero cuando el índice de Lindergaard era igual o superior a 3 pero además había la presencia de síntomas neurológicos agregados a la exploración clínica inicial del paciente y que no pudieran considerarse secundarios a ninguna otra causa o la presencia de infartos en “parches” por TC.

Morbilidad Mayor: Evento de hemorragia subaracnoidea que desarrolla falla en un órgano o mas. Déficit neurológico que incapacite la vida diaria y no permita independencia del sujeto.

GOS : (Glasgow Outcome Scale) : Se divide en cinco grados, grado 1 se refiere a muerte, grado 2 estado vegetativo persistente, grado 3 incapacidad severa, grado 4 incapacidad leve, grado 5 normal.

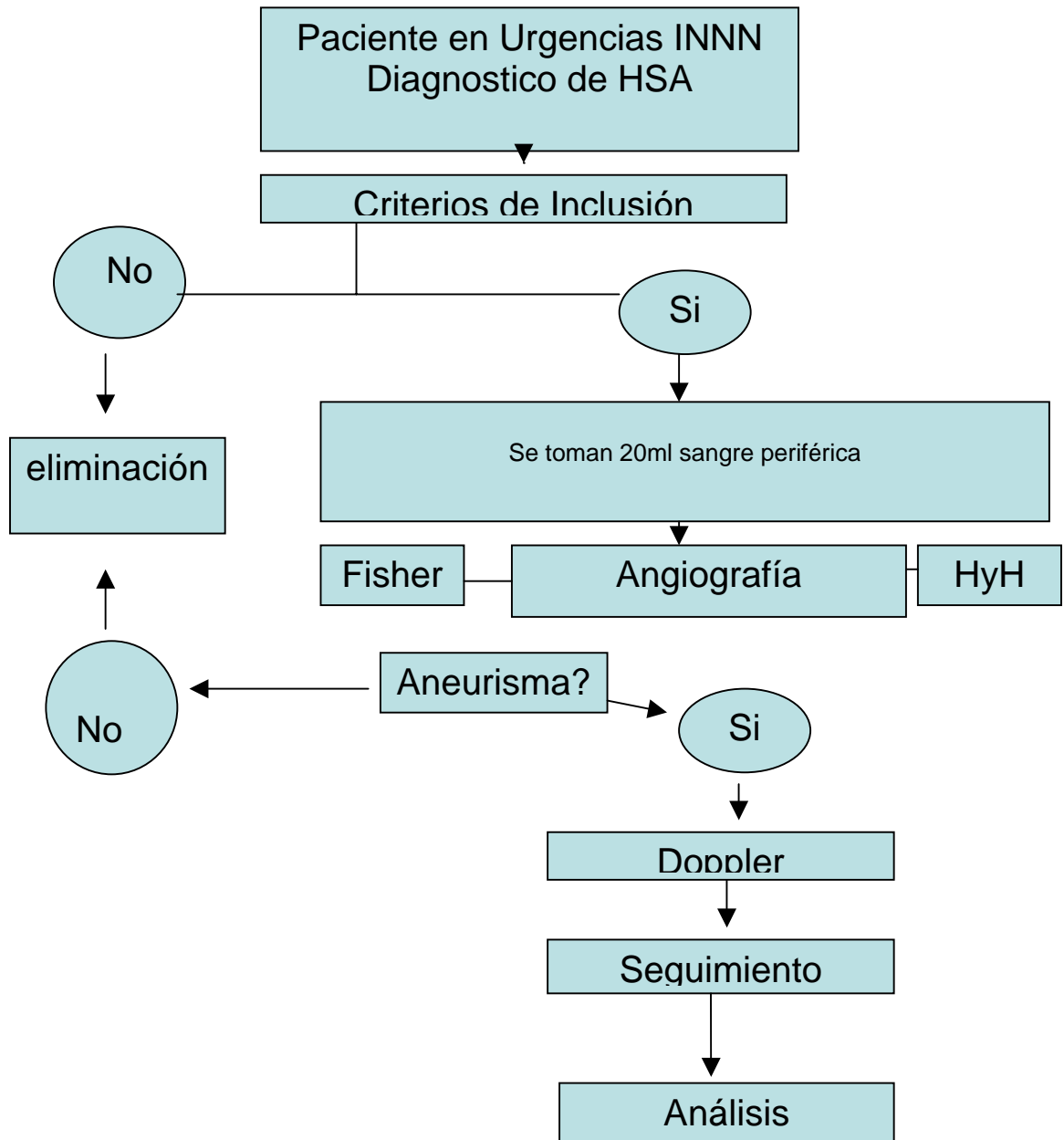
GOS Categórico : Se definió como mal pronostico pacientes con grados 1,2,3 y buen pronostico grados 4 y 5. Otorgando un punto a grados 1,2,3 y 0 puntos a los grados 4,5 esto con fines de evaluación estadística.

GOS Morbimortalidad : esta variable categórica fue muy similar a la anterior pero en este caso solo incluimos a los pacientes que se encontraron en grados 1 y 2 de la escala de Glasgow de Salida.

Hunt y Hess: Escala de severidad utilizada comúnmente en servicios de Neurocirugía en pacientes con hemorragia subaracnoidea. Se divide en cuatro grados I al IV.

Estancia Intrahospitalaria prolongada : Se considero la estancia intrahospitalaria prolongada cuando los pacientes permanecieron dos desviaciones estándar mas de la media de todos los pacientes incluidos en el estudio. En este caso mas de 8 dias de estancia intrahospitalaria.

Algoritmo Metodológico



7.- RESULTADOS

Se lograron captar en total 211 pacientes con diagnóstico de Hemorragia subaracnoidea de forma consecutiva, de estos pacientes solo 37 cumplieron con los criterios de inclusión, la mayoría llegaron después de 24hrs del ictus vascular o provenían de otro hospital.

Los pacientes que se integraron al protocolo debían venir en las primeras 24hrs ya que uno de los objetivos de este protocolo es el de encontrar un indicador bioquímico que pudiera utilizarse como marcador temprano de vasoespaso cerebral y de mortalidad.

De los 37 pacientes incluidos, uno tuvo que ser eliminado del análisis estadístico ya que la muestra para la determinación de Arginina y Citrulina no se encontró en adecuadas condiciones para su estudio.

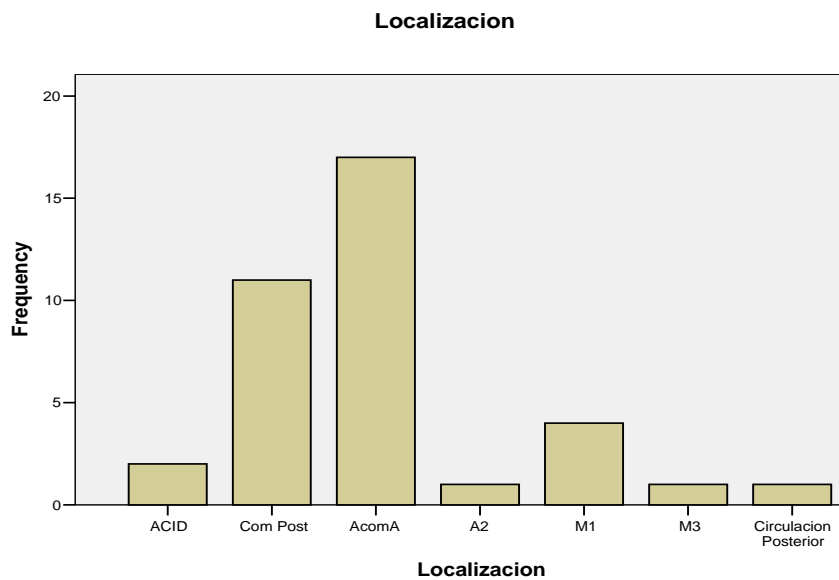
De los 37 pacientes 20 eran mujeres y 17 hombres, la edad promedio fue de 46.97 años, con una mínima de 17 y máxima de 69.

	N	mínima	máxima	Promedio	Std. Deviation
Edad	37	17	69	46.97	13.376

En todos los pacientes se logró diagnosticar la presencia de un aneurisma roto, dos en el segmento coroideo, 11 en el segmento comunicante posterior derecho, 17 en la arteria comunicante anterior, 1 en el segmento A2, 4 en el segmento M1, 1 de circulación posterior 1 hipofisiario. Esta distribución es similar a la

reportada de forma habitual a la literatura encontrando la mayoría de los aneurismas en la arteria comunicante anterior y segmento comunicante posterior.

Frecuencia	Porcentaje
Coroideo	2
Com Post	11
AcomA	17
A2	1
M1	4
Hipofisiario	1
Circulacion Posterior	1
Total	37



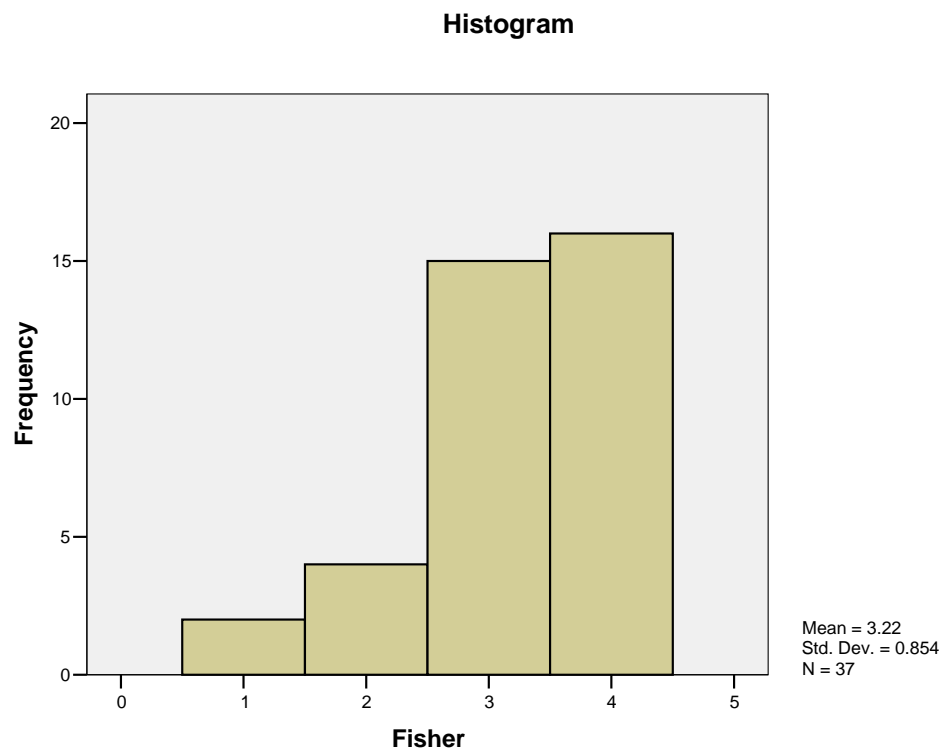
Escala HyH	Frecuencia
HyH1	14
HyH2	23
Total	37

La escala de Hunt y Hess, se encontró de la siguiente forma, en grado uno, 14 pacientes, en grado dos 23 pacientes.

La escala de Fisher, muestra una distribución también parecida a la reportada en la mayoría de la literatura e incluso muy similar a la presentada en el artículo original de este autor.* Fisher uno 2 pacientes, en ambos pacientes se realizó punción lumbar posterior a la toma de la muestra sanguínea. Fisher dos con 4 pacientes, Fisher tres 15 pacientes y Fisher cuatro con 16 pacientes.

Fisher	Frecuencia
Fisher 1	2
Fisher 2	4
Fisher 3	15
Fisher 4	16
Total	37

* Fisher et al. Neurosurgery enero 1980.

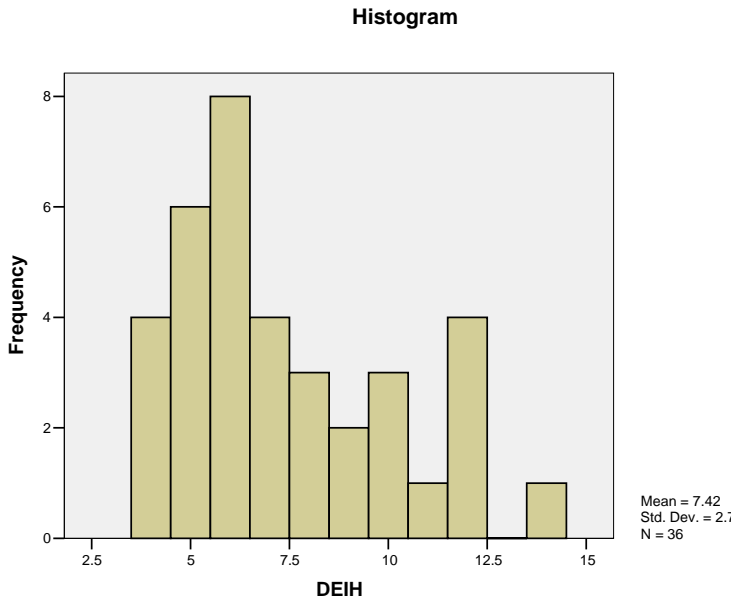


Otra de las escalas que fueron evaluadas al momento del ingreso de los pacientes fue el Glasgow de entrada o inicial, este parámetro ha sido ampliamente descrito en la literatura como uno de los principales factores pronóstico en los pacientes con hemorragia subaracnoidea. 25 pacientes el 67% se presentaron con un Glasgow de 15 es decir el máximo puntaje, 12 pacientes 32.5% se presentaron con Glasgow de entre 12 y 14 . Es decir el 100% de los pacientes que tenemos en este estudio llegaron con una calificación de Glasgow que les confería un buen pronóstico.

La escala de la Federación Mundial de Cirugía Neurológica (WFNS), utiliza precisamente el Glasgow como principal parámetro para establecer la severidad

con la que ingresa un paciente a la sala de urgencias, y divide esta en cuatro grados, siendo los grados I y II los de mejor pronóstico, en nuestra población se encontraron entonces 25 pacientes en Grado I y 12 pacientes en grado II.

Estancia intrahospitalaria



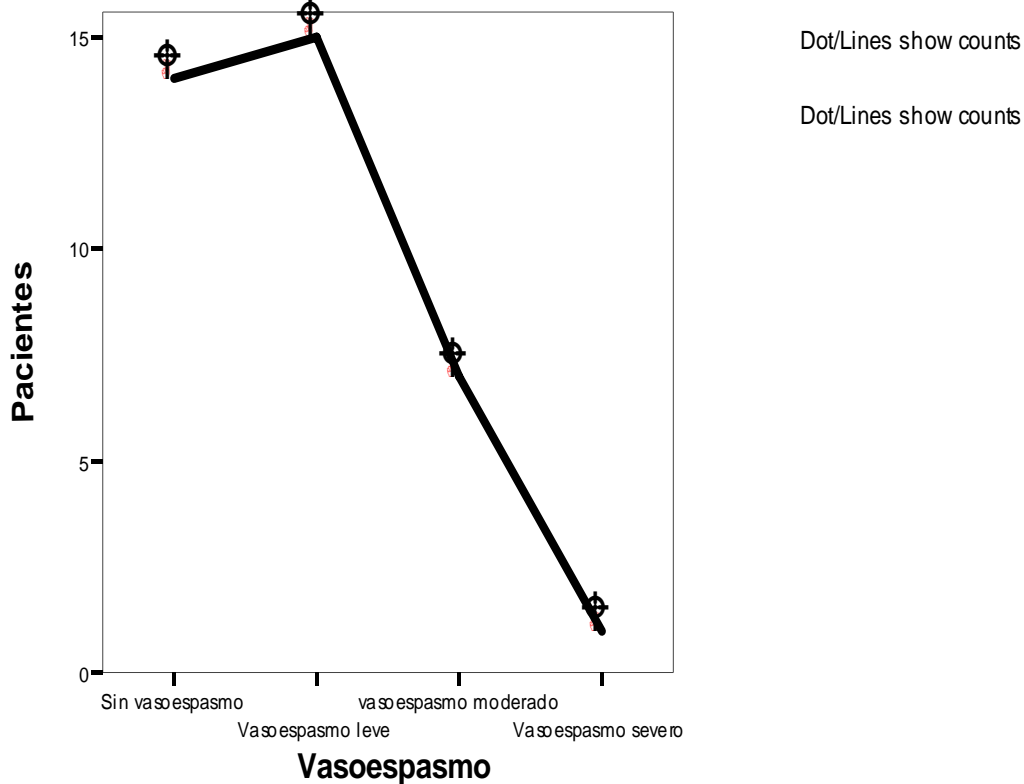
DEIH	Frecuencia	%
4	4	9.3
5	6	14.0
6	8	18.6
7	4	9.3
8	3	7.0
9	2	4.7
10	3	7.0
11	1	2.3
12	4	9.3
14	1	2.3

La mayor frecuencia de estancia intrahospitalaria se encontró en seis días, es decir la mayoría de los pacientes estuvieron internados 6 días independientemente del estado en el que fueron egresados, el mínimo fue de 4 días el máximo de estancia intrahospitalaria para estos pacientes fue de 14 días. La frecuencia se encuentra representada en la tabla. En este caso definimos como estancia intrahospitalaria prolongada aquellos pacientes que permanecieron por más de ocho días, esto definido mediante la media y dos veces la desviación estándar del promedio en nuestro grupo de pacientes. 14 pacientes en total tuvieron una estancia prolongada de acuerdo a nuestra clasificación.

En cuanto a la relación que existe entre la estancia intrahospitalaria prolongada y el Glasgow de salida podemos decir que no hay correlación estadísticamente

significativa, se utilizó una prueba de Mann Whitney al categorizar la estancia prolongada de acuerdo a los criterios establecidos previamente $P= 0.68.$

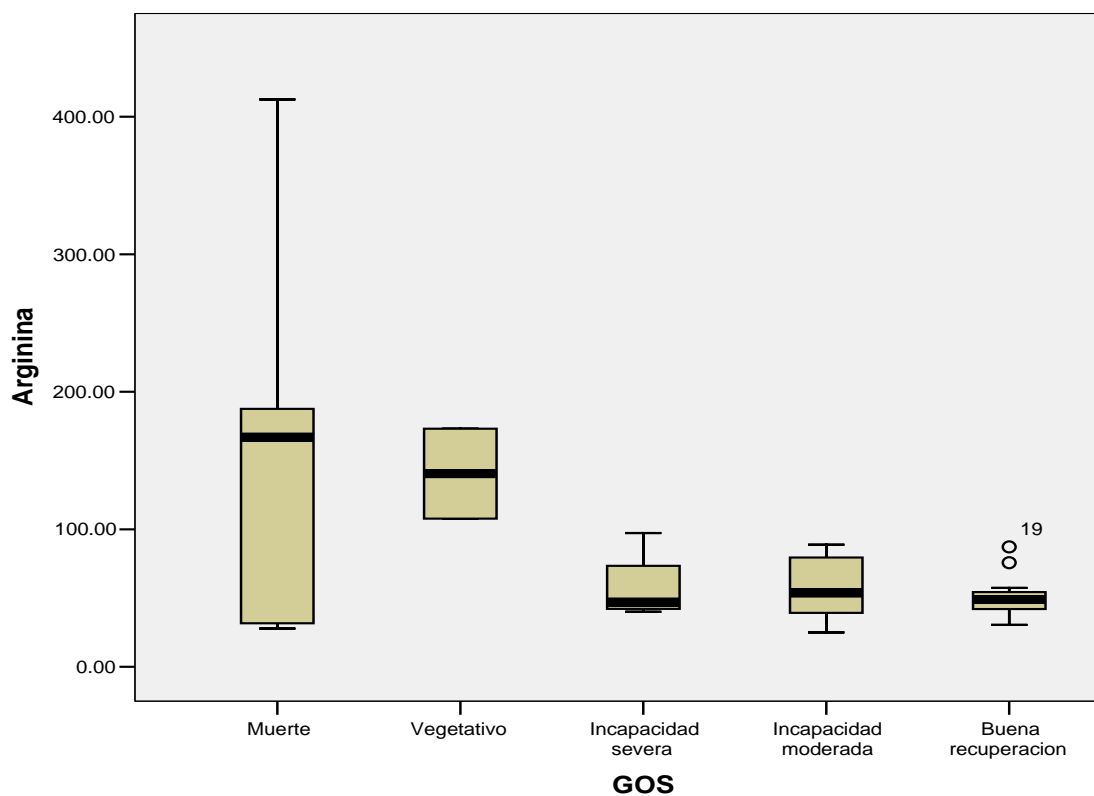
De acuerdo a la escala de valoración de Glasgow de Salida observamos que clasificamos al egreso como estados pobres con morbi mortalidad a los pacientes con GOS de uno o dos, en este caso en nuestro estudio se encontraron 7 pacientes con un estado pobre. El porcentaje de mortalidad fue de 13%, que es similar al reportado habitualmente en la literatura. A partir de estas características demográficas de los pacientes es que iniciamos nuestro análisis estadístico. En cuanto a los pacientes que desarrollaron vasoespasmo encontramos, que 15 pacientes desarrollaron vasoespasmo leve o asintomático únicamente diagnosticado mediante Doppler con índice de Lindergaard igual o superior a tres, 9 desarrollaron vasoespasmo sintomático.



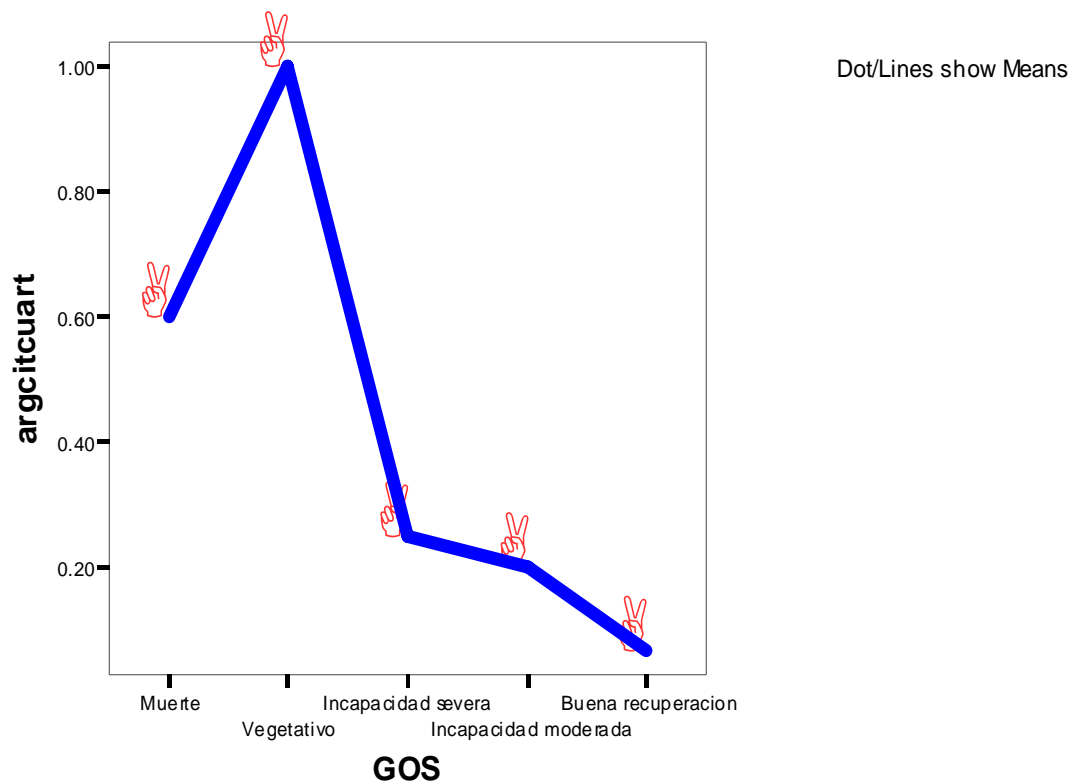
GOS		Frecuencia	Por ciento
	Muerte	5	13
	Vegetativo	2	5
	Incapacidad severa	4	10
	Incapacidad moderada	10	27
	Buena recuperación	16	43

Arginina , Citrulina e índice Arginina/Citrulina

	N	mínimo	Maximo	Promedio	Desv. estándar
Arginina/citrulina	36	1.00	16.69	2.7853	2.71492
Arginina (μM)	36	24.97	412.55	74.0236	70.41194
Citrulina (μM)	36	10.95	60.15	27.6622	8.45459

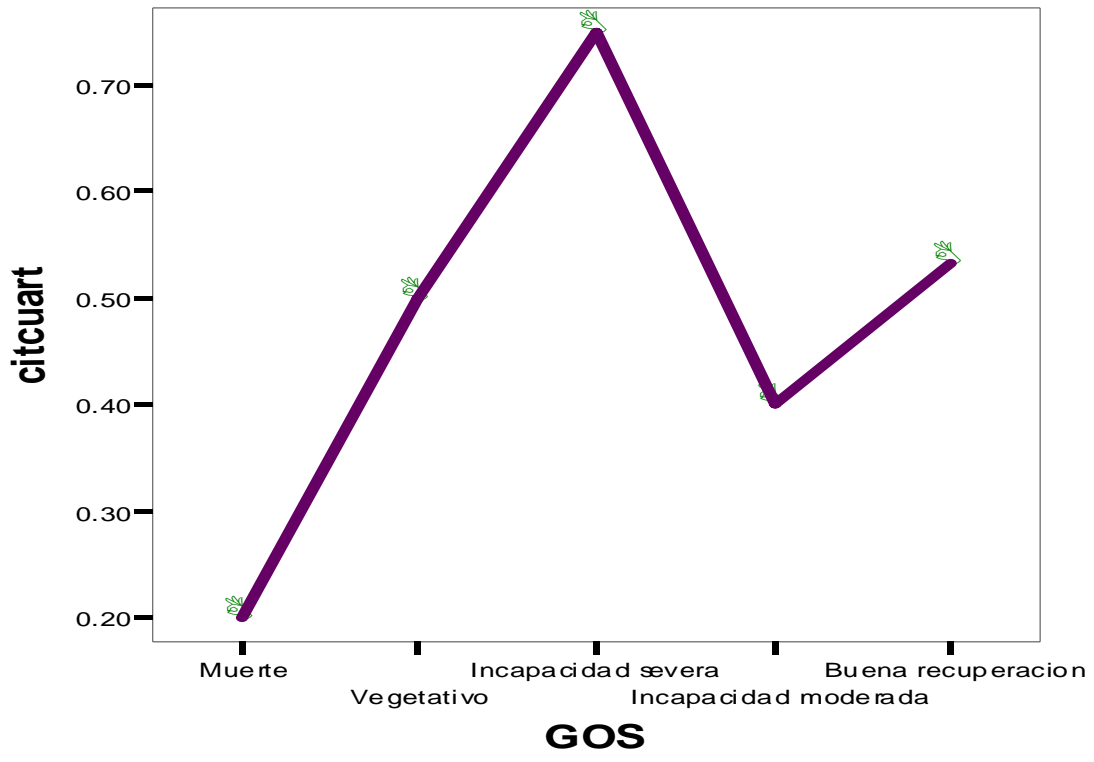


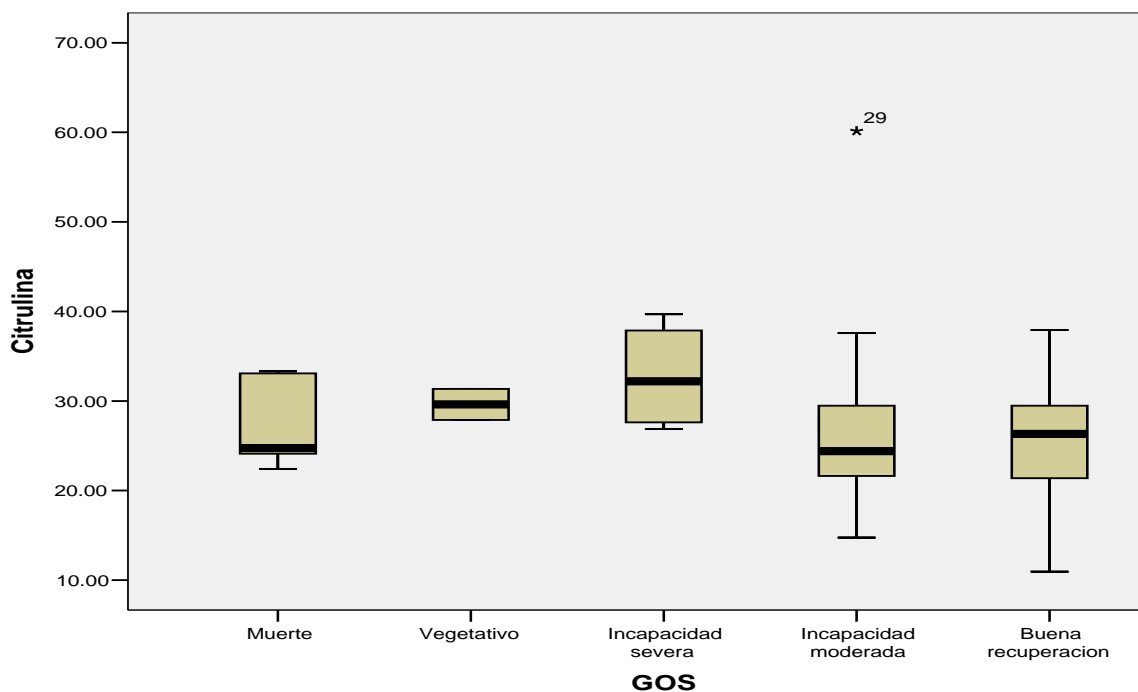
Los valores de Arginina fueron de la siguiente forma, el mínimo encontrado fue de 24.97 μM el maximo de 412.97 μM con un promedio de 74.02 μM y una desviación estándar de 70.41 μM . La citrulina vario mucho menos, con un mínimo de 10.95 μM y maximo de 60.15 μM con una desviación estándar de solo 8.45 μM .



En el análisis de los resultados de Arginina al momento del ingreso del paciente con las condiciones en que el paciente se egreso del servicio encontramos lo siguiente, 24 pacientes tuvieron niveles de L-Arginina que pudieran encontrarse fuera de los rangos que se han reportado en humanos (40 - 70 μ M) en personas aparentemente sin patología alguna(24).

13 pacientes tuvieron niveles superiores a 70 μ M. Al relacionar los pacientes con niveles por arriba de 70 μ M con la evolución del paciente durante su internamiento hay una elevación estadísticamente significativa en cuanto a los niveles de Arginina y los pacientes que tienen grados pobres principalmente 1 y 2 en la escala de Glasgow de salida (GOS), es decir a mayor concentración de Arginina mayor posibilidad de obtener puntajes de Glasgow mas bajos.





Se decidió realizar una división de los niveles de Arginina en cuartiles esto con el fin de simplificar el análisis estadístico comparativo entre los pacientes con niveles altos de L-Arginina y el grado que obtuvieron en cuanto al egreso se refiere.[∇]

Variable	Prueba	Valor P
Genero (Sexo)	Mann Whitney U	.324
Fisher	Mann Whitney U	.383
Arginina Categorica	Mann Whitney U	.054
Hb	Pearson	0.22
Leucocitos	Pearson	0.71
Glucosa	Pearson	0.05

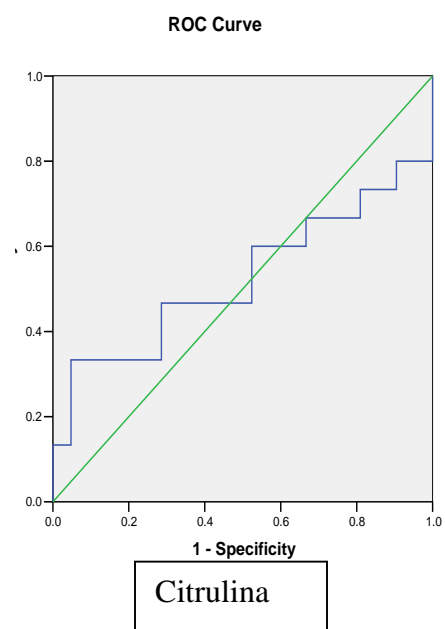
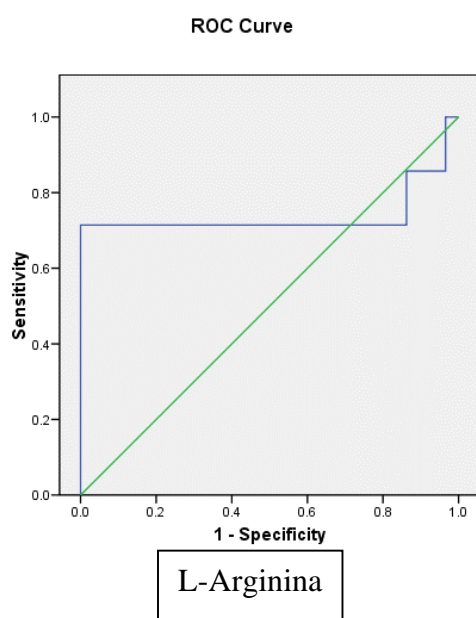
Tabla. Muestra las variables utilizadas para correlacionar inicialmente con el pronostico de acuerdo a la clasificacion de Glasgow de Salida. Observamos que La glucosa y La Arginina categorica *(Arginina igual o superior a 74) alcanzan significancia estadistica

[∇] En la grafica observamos la division de los valores obtenidos de la Citrulina y graficandolos contra la escala de Glasgow de Salida, como apreciamos claramente los pacientes con estados pobres neurologicos se encuentran en los cuartiles 50 % y 75%, a diferencia de los pacientes que se encuentran con grados de discapacidad moderada a buena recuperacion que se encuentran en el cuartil 25%.

En el caso de la citrulina encontramos que no fue significativa la diferencia entre los niveles mas superiores e incluso por arriba de la media con el desarrollo de vasoespasmo sintomático, ni con la clasificación de Glasgow de salida de los pacientes (P= 0.98) Los niveles de citrulina no variaron significativamente entre los grupos acorde al egreso del paciente (T Student P= 0.87) Sin embargo al graficar los cuartiles de los resultados de Citrulina a pesar de no ser estadísticamente significativos prácticamente inverso al encontrado en los resultados de L-Arginina.

Realizamos una curva de ROC para encontrar el valor al cual la L-Arginina podría predecir con mejor sensibilidad “mal pronostico” en los pacientes con hemorragia subaracnoidea, definiendo mal pronostico pacientes con grados en la escala de Glasgow de Salida de entre 1 y 2 ya fuera muerte o con estados de discapacidad severa.

La curva mostró un valor de 100.2 μM como el valor al cual el 74% de los pacientes presentaran una escala de Glasgow de Salida de entre 1 y 2.



Realizamos el mismo procedimiento para evaluar si existía una asociación entre los niveles de L-Arginina y el vasoespasmio sintomático, encontrando lo siguiente, la sensibilidad mas alta para la L-Arginina por arriba de 100.2 μ M es solo de 54%, en este caso la arginina como marcador para detectar en etapas tempranas la posibilidad de vasoespasmio no es mayor que las escalas utilizadas en la actualidad como puede ser la escala de Fisher.

Variable	Prueba	Valor P
Genero (Sexo)	Mann Whitney U	.424
Fisher	Mann Whitney U	.633
Hunt y Hess	Mann Whitney U	.087
Hb	Pearson	0.32
Leucocitos	Pearson	0.08
Glucosa	Mann Whitney U	0.03
Na	Mann Whitney U	0.54
K	Mann Whitney U	0.89
Cl	Mann Whitney U	0.54

Tabla. Muestra las variables utilizadas para correlacionar los parámetros de laboratorio utilizados habitualmente en los pacientes con diagnostico de Hemorragia Subaracnoidea con los niveles de Arginina. * Se utilizo nuevamente la variable de Arginina Categorica.

Análisis Multivariado.

Tomando en cuenta las correlaciones realizadas en los análisis previos y resumidas en la tabla previa, se decidió realizar el análisis multivariado siguiente:

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I. for EXP(B)		
							Lower	Upper	
Step 1	argcuart(1)	4,257	2,130	3,996	1	,046	70,607	1,087	4586,769
	Glucosa	,010	,012	,662	1	,416	1,010	,987	1,033
	Plaquetas	,000	,000	,862	1	,353	1,000	1,000	1,000
	Leucos	,001	,000	2,524	1	,112	1,001	1,000	1,001
	Constant	-12,236	6,242	3,843	1	,050	,000		

a. Variable(s) entered on step 1: argcuart, Glucosa, Plaquetas, Leucos.

Hosmer and Lemeshow Test

Step	Chi-square	df	Sig.
1	6,172	7	,520

En el análisis encontramos que el vasoespasmo sintomático, únicamente estuvo significativamente asociado con niveles de Arginina por arriba de 100.2 μM , y de glucosa por arriba de 200mg/dl al momento de su ingreso.

Al realizar análisis mediante regresión logística encontramos que la arginina por arriba de 100.2 μM definida ya previamente como Arginina1, alcanza significancia estadística $P < 0.05$ como factor independiente para desarrollar vasoespasmo sintomático, con un factor de riesgo de 70/1, el valor de Hosmer y Lemeshow con una significancia de .520

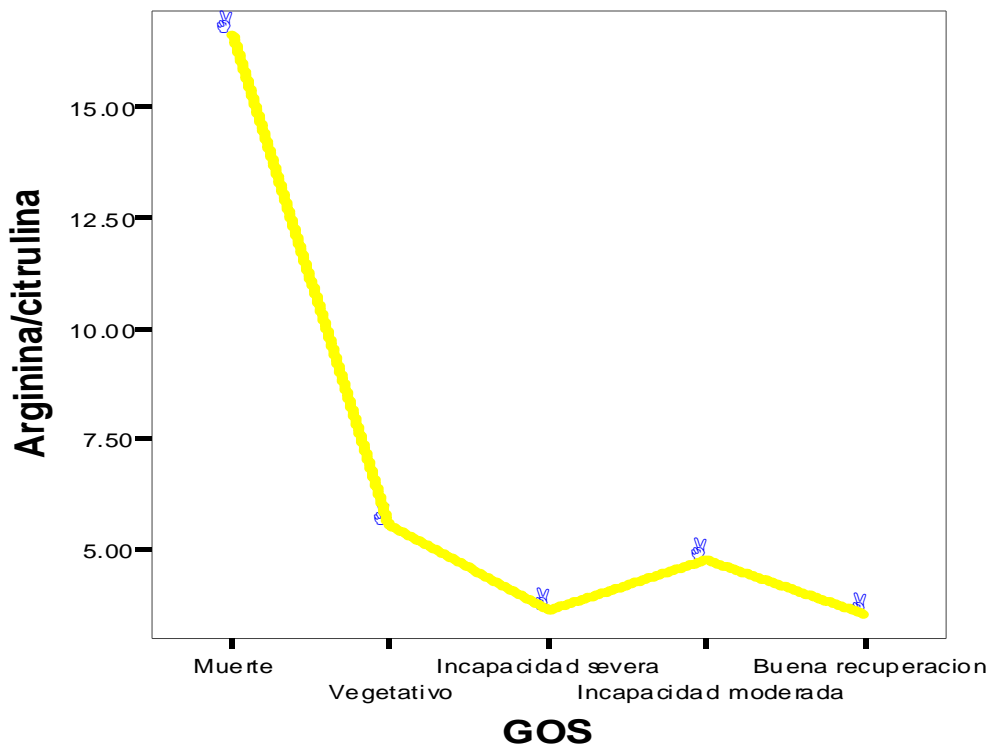
En cuanto al análisis para encontrar los factores asociados a una calificación en la escala de Glasgow de salida no favorable encontramos como significativos nuevamente a la Arginina1 y Glucosa, nuevamente las escalas habituales fallaron en la adecuada asociación con la clasificación pronostica. Se realizo nuevamente una regresión logística para determinar y corroborar estos dos factores como independientes y se encontró que en este caso, tanto la glucosa por arriba de 200mg/dl como la Arginina por arriba de 100.2 μ M son factores de mal pronostico es decir los pacientes con 100.2 μ M de Arginina y/o de glucosa por arriba de 200mg/dl tienen una probabilidad mas alta de obtener al egreso puntajes de 1,2,3 en la escala de Glasgow de salida. El riesgo es de 70/1

		Coeficientes		Standardized Coefficients	t	Sig.
1	(Constant)	.044	.212		.208	.837
	Glucosa	.170	.067	.284	2.543	.017
	Edad	.001	.003	.018	.169	.867
	Escala HyH	-.014	.053	-.033	-.262	.795
	Vasoespasma sintomático	.053	.057	.124	.921	.365
	Fisher	-.036	.057	-.077	-.628	.535
	Arginina1	.813	.148	.710	5.485	.002

INDICE L-ARGININA/CITRULINA

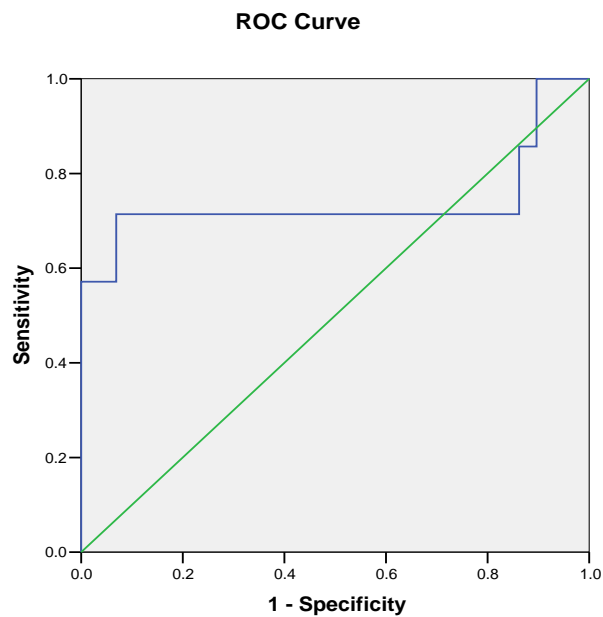
		Arginina/cit rulina	GOScat
Arginina/citrulina categorizadas	Pearson Correlation	1	.520(**)
	Sig. (2-tailed)		.001
	N	36	36
GOScat	Pearson Correlation	.520(**)	1
	Sig. (2-tailed)	.001	
	N	36	37

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



En este caso como observamos en la prueba de Pearson, el índice L-Arginina/Citrulina es estadísticamente significativo con una $p < 0.001$ cuando se trata de encontrar los pacientes con mal pronóstico. En este paso realizamos el mismo procedimiento que para la L-Arginina, es decir dividimos los resultados en cuartiles comparando la escala de Glasgow de salida con el promedio en los resultados en cada cuartil. En la grafica observamos estos resultados y encontramos un patrón muy similar a los resultados encontrados en L-Arginina.

Se realizo igualmente una curva de ROC para encontrar el valor al cual el índice L-Arginina/Citrulina es mas sensible para predecir estados de morbimortalidad, es decir grados 1 y 2 de la escala de Glasgow de Salida encontrándose los



siguientes resultados: La mayor sensibilidad fue cuando el índice era igual o superior a 3.74, con una sensibilidad de 74%, no superior similar a la encontrada para la L-Arginina, estos resultados muestran una asociación muy parecida a la encontrada con Arginina (*Argcuart), mediante el mismo analisis multivariado pero en esta ocasión eliminamos Argcart, colocando en su lugar Arg/citrulina igualmente categorizada en igual o superior a 3.74. el factor de riesgo corroborado por regresión logística es igualmente de 70/1 y los valores de Hosmer y Lemeshow de .620, con una significancia estadística de .044. Estos

resultados son claramente gobernados por Arginina y la utilidad de el índice es pobre una vez que se obtienen los mismos resultados con la simple Arginina.

RESULTADOS GENETICA

Se tomaron muestras sanguíneas a los pacientes que aceptaron participar en este segundo brazo del estudio y que habían participado en el primero, la intención fue de encontrar si había relación entre los niveles de L-Arginina - Citrulina, el desarrollo de Vasoespasmo sintomático con la presencia del polimorfismo genético 4a/4b, este polimorfismo genético se ha implicado en la susceptibilidad del paciente para el desarrollo de vasoespasmo. En la tabla se muestran las características clínicas de los pacientes, que son las mismas que se presentaron en la primer parte del estudio.

ID Paciente	Edad	Sexo	Loc. Aneurysm	Hunt y Hess	Fisher	EFNS	Vasoespasmo Sintomatico
ON-01	17	M	AcomA	HyH1	Fisher 4	WF 1	Si
ON-02	53	M	AcomA	HyH2	Fisher 4	WF 2	No
ON-03	46	F	Post. Comm.	HyH2	Fisher 3	WF 1	No
ON-04	52	F	M1	HyH2	Fisher 3	WF 2	No
ON-05	58	M	AcomA	HyH1	Fisher 4	WF 2	Si
ON-06	48	F	Post. Comm.	HyH2	Fisher 3	WF 1	No
ON-07	43	M	Post. Comm.	HyH2	Fisher 4	WF 1	No
ON-08	55	M	AcomA	HyH2	Fisher 4	WF 2	No
ON-09	36	F	M1	HyH1	Fisher 1	WF 1	No
ON-10	22	M	M2	HyH2	Fisher 4	WF 1	No
ON-11	64	F	AcomA	HyH2	Fisher 4	WF 1	No
ON-12	41	F	Post. Comm.	HyH1	Fisher 2	WF 1	No
ON-13	48	F	Chroid Segm.	HyH2	Fisher 4	WF 2	Si
ON-14	45	F	Post. Comm.	HyH2	Fisher 4	WF 2	Si
ON-15	63	M	AcomA	HyH2	Fisher 3	WF 1	Si
ON-16	52	F	M1	HyH2	Fisher 4	WF 1	No
ON-17	42	M	AcomA	HyH2	Fisher 3	WF 1	No
ON-18	41	M	AcomA	HyH1	Fisher 4	WF 1	No
ON-19	38	F	Post. Comm.	HyH2	Fisher 2	WF 1	No
ON-20	20	M	PICA	HyH2	Fisher 4	WF 1	Si

Investigamos dos polimorfismos básicos de la enzima Oxido Nítrico sintasa endotelial.

En el intron 4 existe una secuencia de 27 pares de bases con un alelo anormal Sin embargo en todos los pacientes la secuencia de este intron 27*VTNR fue la misma como observamos en la tabla d resultados. Las secuencias obtenidas fueron 5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3' (forward) para eNOS 4b/4b, las condiciones de ciclado fueron de 95° por cinco minutos , 35 ciclos a 93° por un minuto y a 72° por dos minutos. Como apreciamos en la tabla se compararon los niveles de L-Arginina por arriba de 100.02 *Arginina1, con la presencia o ausencia de este gen polimorfoico, sin embargo en todos los casos se encontró, como ya se menciono la misma secuencia de pares de bases.

ID paciente	Doppler TC	Arginina 1	Vasoespasmo Sintomatico	27(VTNR)
ON-01	No	No	No	4b/b
ON-02	Yes	Yes	Yes	4b/b
ON-03	Yes	Yes	Yes	4b/b
ON-04	No	No	No	4b/b
ON-05	No	Yes	Yes	4b/b
ON-06	No	Yes	No	4b/b
ON-07	Yes	Yes	Yes	4b/b
ON-08	Yes	Yes	Yes	4b/b
ON-09	No	No	No	4b/b
ON-10	No	No	No	4b/b
ON-11	No	Yes	Yes	4b/b
ON-12	Yes	Yes	No	4b/b
ON-13	Yes	Yes	Yes	4b/b
ON-14	No	No	No	4b/b
ON-15	Yes	Yes	Yes	4b/b
ON-16	Yes	Yes	No	4b/b
ON-17	No	No	No	4b/b
ON-18	No	No	No	4b/b
ON-19	No	No	No	4b/b
ON-20	No	No	No	4b/b

8.- DISCUSION

En épocas recientes han existido numerosos estudios que demuestran el rol fundamental que juega el Oxido Nítrico con la regulación del tono vascular y como mediador de los procesos inflamatorios, agregación plaquetaria adhesión monocítica etc. La hemorragia subaracnoidea continua siendo una de las principales causas de morbi - mortalidad en nuestro Instituto por esto es importante continuar la identificación de factores que pudieran hacer diferencia en cuanto al pronostico de estos pacientes se refiere.

En este estudio encontramos resultados muy similares a otros sobre este tema en cuanto a las características demográficas se refiere, es decir, encontramos que la mayoría de los pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suarez , un porcentaje similar en cuanto al genero, 20 mujeres y 17 hombres la edad promedio, la localización de los aneurismas _es similar a la reportada ya con anterioridad. Todos nuestros pacientes se encontraron en grados de Hunt y Hess y de la federación mundial de cirugía neurológica considerados como buenos es decir grados 1 o 2 de ambas escalas. La morbi mortalidad en nuestro estudio tampoco vario con respecto a lo expuesto ya con anterioridad tanto en otros centros como por otros autores, la mortalidad fue de 13% y morbilidad de 18%.

La complejidad de la regulación del Oxido Nítrico es muy alta, y el propósito de este trabajo es evaluar el posible papel de esta molécula en la morbi mortalidad de los pacientes con hemorragia subaracnoidea. El estudio pretendió dar a conocer que el sustrato para la formación de Oxido Nítrico mediante la oxido nítrico sintasa se puede utilizar como marcador bioquímico de severidad en estos pacientes, pero además tratar de entender que sucede a este nivel para futuras

investigaciones con respecto a terapias medicas que pudieran mejorar el pronostico de estos pacientes.



La teoría de este trabajo parte de la base que la L-Arginina actúa como sustrato para la producción de Oxido Nítrico, y nuestra forma de evaluar esta vía fue precisamente la relación de la L-Arginina con la citrulina como se muestra en el esquema.

Las alteraciones que se producen en esta vía pueden presentarse desde el momento en que existe un daño en el endotelio, es decir en el momento en que existe la ruptura aneurismática.

En este caso encontramos lo siguiente: Niveles muy dispersos de L-Arginina en los pacientes con un rango muy amplio, entre 28 y 412 μ M, Niveles mas constantes de L-Citrulina en los pacientes, se decidió realizar la division de estos resultados en cuartiles encontrando sistemáticamente que los niveles de L-Arginina en el cuartil mas alto coincidía con los pacientes que tuvieron una calificación de Glasgow de Salida mas pobre, mediante el analisis multivariado entre los niveles en este cuartil contra los pacientes que presentaron estados neurologicos pobres (Estado Vegetativo y Muerte) se encontro una asociación estadísticamente significativa con una $P < 0.05$, el

aumento en los niveles de L-Arginina por arriba de 100.2 μ M, se traduce en un paciente tiene 70 veces mas posibilidades de muerte que los pacientes con niveles bajos de L-Arginina, La presencia de L-Arginina elevada entonces nos lleva a pensar en toda la vía metabólica intracelular de este aminoácido durante su proceso hasta la activación de la forma inducible de la oxido nítrico sintasa.

La presencia excesiva de L-Arginina con niveles constantes de Citrulina sugiere que la conversión de L-Arginina a ON mediante la Oxido nítrico Sintasa se encuentra disminuida ocasionando entonces una acumulación de L-Arginina y niveles constantes de Citrulina.

Encontramos en este trabajo que los niveles en plasma de L-Arginina por arriba de 100.02 μ M se asocian de forma estadísticamente significativa con los pacientes que presentan estados neurológicos pobres al egreso, es decir, con el pronostico del pacientes, y que niveles superiores a 100.2 se asocian 70/1 con la mortalidad de estos pacientes. En este estudio, el índice L-Arginina/Citrulina esta dirigido por la L-Arginina, y la citrulina no parece tener un factor pronóstico en estos pacientes. Es importante en un futuro aumentar la población de la muestra.

En este trabajo no encontramos correlación estadísticamente significativa entre la escala utilizada habitualmente para predecir vasoespasmo (Fisher) y el desarrollo del mismo de forma sintomática, tampoco encontramos relación alguna entre esta escala y la morbi mortalidad. Como se ha mencionado en trabajos diversos el estado del paciente al momento del ingreso es uno de los marcadores mas importantes para conocer el pronostico del paciente, pero no contamos con un marcador que funcione como pronostico entre los pacientes que acuden al servicio de urgencias en condiciones neurológicas aceptables grados I y II de escala de Fisher, Hunt y Hess y I federación mundial de cirugía neurológica.

Partiendo del conocimiento que existe sobre el gen codificante para la Oxido Nitrico Sintasa que resulta ser polimorfico en humanos, buscamos una explicacion a por que en algunos pacientes esta enzima se encuentra incapaz de mantener una producción adecuada de ON, relacionando la existencia de alguna variación genetica en la enzima y relacionando estas variaciones con nuestra muestra en estudio sin embargo en todos los casos que analizamos con este fin encontramos el gen 4b/b y no su polimorfismo b/a.

9.- CONCLUSIONES

El presente trabajo sugiere que en los pacientes con hemorragia subaracnoidea existe una alteración en la vía metabólica encargada de la producción y regulación del Oxido Nítrico a nivel endotelial que sugiere la baja producción de ON.

Debemos pensar que la activación de la Oxido Nítrico Sintasa en su forma se encuentra alterada de tal forma que provoca la acumulación de L- arginina. Las causas de tal comportamiento de la enzima deberán estudiarse a fondo, nosotros iniciamos este proceso de investigación mediante la determinación de la existencia o no de polimorfismos genéticos de la enzima que pudieran hacer esta más susceptible a la propia incapacidad para producir oxido nítrico, sin embargo aun cuando nuestra muestra es pequeña no encontramos este gen polimorfo que algunos autores habían supuesto podría tener relación con la susceptibilidad a desarrollar vasoespasmo.

La L-Arginina medible en plasma sanguíneo al momento del ingreso del paciente por arriba de $100\mu\text{M}$ representa un riesgo de mortalidad de 70 a 1 contra los pacientes que presentan niveles dentro de rangos considerados como normales (Entre 40 y $70\mu\text{mol}$).

La presencia de L-Arginina de $100.02\mu\text{M}$ o más al momento del ingreso del paciente con diagnóstico de Hemorragia subaracnoidea puede utilizarse como factor pronóstico en estos pacientes, y abre las puertas para intentar nuevas terapias médicas como el uso de Estatinas y algunos esteroides para el tratamiento adyuvante de estos pacientes.

La causa de la disfunción enzimática aun no está clara, nuestra intención fue la de buscar si existía alguna relación con los polimorfismos genéticos y los pacientes en quienes hay clara alteración de la ONS endotelial, sin embargo en

todos los casos analizados hasta el momento no hubo ningún polimorfismo genético, es necesario en este sentido tener una muestra representativa ya que la actual no alcanza dichos valores.

10.- BIBLIOGRAFIA

1. Treginarri – Venzi M. et al. Review of medical prevention of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A problem of neurointensive care. *Neurosurgery*, 48: 248 -262. Febrero 2001.
2. Adnan I. et al. Early predictors of outcome in patients receiving hypervolemic and hypertensive therapy for symptomatic vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Crit. Care med.* 28 : 824 – 829. Marzo 2000.
3. Wai Hoe et al. Nitric Oxide and subarachnoid hemorrhage : Elevated levels in cerebrospinal fluid and their implications. *Neurosurgery* 49 : 622 – 626 Septiembre 2001.
4. Tonu Ratsep. Et al. Cerebral hemodynamic impairment after subarachnoid hemorrhage as evaluated using transcranial Doppler ultrasonography : relationship to delayed cerebral ischemia and clinical outcome. *J. Neurosurgery* 95 : 393 -401. Septiembre 2001.
5. Rabinstein Alejandro. Et al. Predictors of cerebral infarction in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 1862 – 1866. Agosto 2004.
6. Vini G. Khurana. Et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms predict susceptibility to aneurysmal subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm. *Jour. Cer. Blood Flow and Met.* 24 : 291 -297 Marzo 2004.
7. Marcos D. Barbosa et al. The novel 5-Lipoxygenase inhibitor ABT-761 attenuates cerebral vasospasm in a rabbit model of subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 49: 1205- 1213. Nov 2001.
8. Chow Michael, et al. Endothelin receptor antagonists and cerebral vasospasm. An Update. *Neurosurgery* 51 : 1333 – 1339. Diciembre 2002.

9. Ahmad Khaldi et al. Measurement of nitric oxide and brain tissue oxygen tension in patients after severe subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 49: 33-39 Julio 2001.
10. Parra Augusto, et al. Effect of prior statin use on functional outcome and delayed vasospasm after acute aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A matched controlled cohort study. *Neurosurgery* 56 : 476 - 484. Marzo 2005.
11. Aaron Dummont. Et al. Cerebral Vasospasm after subarachnoid hemorrhage : Putative role inflammation. *Neurosurgery* 1 : 123 - 135. Julio 2003.
12. Jon Sen et al. Triple H Therapy in the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *The lancet* 2: 10 : Octubre 2003.
13. Nicholas W. C et al. Therapeutic Approaches to vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Curr. Opin. Critical Care* 8: 128 - 133. 2002.
14. Matthew J. et al. Serum von Willebrand factor, Matrix Metalloproteinase - 9, and vascular endothelial growth factor levels predict the onset of vsospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 51 : 1128 - 1135. Nov 2002.
15. Aihira Yasuo et al. Effects of a nitric oxide donor on and correlation of Changes in cyclic nucleotide levels with experimental vasospasm. *Neurosurgery* 52 : 661 - 667 Marzo 2003.
16. Perez-Neri I, Castro E, Montes S, Boll MC, Barges-Coll J, Soto-Hernandez JL, Rios C. Arginine, citrulline and nitrate concentrations in the cerebrospinal fluid from patients with acute hydrocephalus. *J Chromatogr B.* 2007; 851:250-6.
17. Colombo MG., Paradossi U., Andreassi MG., Botto N., Manfredi S., Masseti S., Biagini A., Clerico A. endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 2003;49:389-395.

18. Hassan A., Gormley K., O'Sullivan M., Knight J., Sham P., Vallance P., Bamford J., Markus H. Endothelial nitric oxide gene haplotypes and risk of cerebral small-vessel disease. *Stroke* 2004;35:654-659.
19. Khurana VG., Sohni YR., Mangrum WL., McClelland RL., O'Kane DJ., Meyer FB., Meissner I. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms predict susceptibility to aneurysmal subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm. *J Cereb Blood flow metabol.* 2004;24:291-297.
20. Markus HS., Ruigrok Y., Ali N., Powell JF. Endothelial nitric synthase exón 7 polimorphism ischemic cerebrovascular disease, and carotid atheroma. *Stroke* 1998; 29:1908-1911.
21. Moncada S.,Palmer., Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology., and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
22. Wang XL., Sim AS., Badenhop RF., Mc Credie RM., Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996;2:41-45.
23. Keilhoff G, Reiser M, Stanarius A, Aoki E, Wolf G. Citrulline Immunohistochemistry for Demonstration of NOS Activity *in Vivo* and *in Vitro*. *Nitric Oxide* 2000; 4: 343-353.
24. Pollok J,S. Forstermann U. Mitchell J.A. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from a cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci USA.* 88: 10480-10484. 2006.
25. Boger Rainer. Arginine Metabolism : Enzimology,Nutrition and clinical significance. *J. of Nutrition.* 2004. 28448 Sup.