

Concentraciones plasmáticas de serotonina y de arginina en pacientes con cefalalgias

Drs. Betty Martínez, Luis González, Elizabeth Silva, Dubelia Montoya, Rosario Moreno, Pedro Rada, Luis Hernández*

RESUMEN

Pacientes que presentaron cefalalgia de regular a severa fueron atendidos en el Hospital Tipo I de Coloncito, se les hizo una historia clínica y se les tomó una muestra de sangre venosa. La sangre fue centrifugada y se separó el plasma. Este fue sometido a diálisis mediante una sonda de 2 cm de largo hecha con un tubo de diálisis de 200 micras de espesor y que tenía un corte de peso molecular de 13 KiloDaltons. Los dializados fueron examinados mediante cromatografía líquida de alta presión con detección electroquímica (HPLC-EQ) y electroforesis capilar en zonas con detección mediante fluorescencia inducida por láser. En el primer caso los dializados fueron inyectados directamente al cromatógrafo y fueron medidos los niveles de serotonina y de ácido 5-hidroxiindolacético. En el segundo caso las muestras fueron derivatizadas con isotiocianato de fluoresceína, inyectadas en un equipo de electroforesis capilar y fueron medidas las concentraciones de arginina, ácido glutámico y ácido aspártico. Las mediciones de serotonina permitieron detectar dos poblaciones de pacientes. Una tenía niveles de serotonina superiores a los 250 picogramos (pg) en 20 microlitros de dializado (28 pacientes) y otra tenía las concentraciones plasmáticas de serotonina por debajo de 120 pg en 20 microlitros de dializado (6 pacientes). La diferencia de las concentraciones de serotonina en estos dos grupos fue significativa estadísticamente, pero no la de los niveles de ácido aspártico y glutámico; los niveles de arginina fueron diferentes. Se encontró que los pacientes que tenían bajos niveles de serotonina en los dializados de plasma, también tenían altos niveles de arginina en los dializados de plasma. Cuando se estudiaron los correlatos clínicos de la cefalalgia en los dos grupos de pacientes, se encontró que los pacientes del grupo de alta concentración de serotonina tenían cefalalgia de comienzo

en la frente mientras que los del grupo de baja concentración de serotonina tenían el comienzo de la cefalalgia preferencialmente en las sienes. La presencia de náuseas fue significativamente mayor en los pacientes con baja serotonina pero los pacientes del grupo de serotonina alta tenían vómitos con más frecuencia. El dolor era pulsátil y opresivo en los pacientes con baja concentración de serotonina en los dializados de plasma y en ambos grupos de pacientes el dolor se acentuaba al flexionar el cuello. Se concluye que los análisis químicos permiten detectar dos poblaciones de pacientes con cefalalgia y que la población con bajos niveles de serotonina tiende a tener elevados niveles de arginina. Como esta última es la precursora del óxido nítrico, es muy probable que los pacientes del grupo de serotonina baja deben tener muy activa la vía de producción de óxido nítrico.

Palabras clave: Óxido nítrico. Arginina. Serotonina. Cefalalgia.

INTRODUCCIÓN

Las cefalalgias, o dolores de cabeza, son un motivo muy frecuente de consulta en las instituciones asistenciales y causan incapacidad para trabajar así como trastornos emocionales severos. En el pasado se ha tratado de dilucidar el papel que algunas sustancias químicas juegan en la producción de las cefalalgias. Quizás la sustancia más estudiada ha sido la serotonina. Fueron tratadas exitosamente las cefalalgias con 5-hidroxitriptofano, el precursor de la serotonina (1,2). El tratamiento con antidepresores tricíclicos alivia las cefalalgias. Estas sustancias bloquean la recaptura de monoaminas, incluyendo la serotonina, y aumentan los niveles extracelulares

*Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

de las mismas tanto en el plasma como en el medio intersticial del cerebro (3,4). El tratamiento con un inhibidor de recaptura de la serotonina llamado femoxetine reduce el porcentaje de pacientes con cefalalgia (5). Las drogas antagonistas de los receptores serotoninérgicos de tipo 5-HT1 y 5-HT2, son analgésicos efectivos en el tratamiento de los dolores de cabeza (6-12).

Se han encontrado además muchas evidencias de que el metabolismo de la serotonina en la sangre está alterado en los pacientes que sufren dolores de cabeza. En pacientes que sufren dolor de cabeza en racimo, la actividad de la monoaminaoxidasa en las plaquetas es significativamente menor que en pacientes que no padecen cefalalgia (13). La unión de la serotonina marcada a linfocitos así como la unión de imipramina tritizada a las plaquetas de pacientes que sufren dolores de cabeza crónicos es menor durante las crisis que en los períodos intercrisis (14,15). La migraña se asocia con disminución del contenido de serotonina de las plaquetas (16). La serotonina aumenta en el plasma de los pacientes con migraña (17) pero el contenido de serotonina en las plaquetas disminuye (18,19). La recaptura de la serotonina está disminuida en las plaquetas de pacientes que tienen dolor de cabeza tensional (20). En los pacientes con dolor de cabeza tensional está aumentado el contenido de serotonina en las plaquetas (21,22). Los niveles de serotonina plasmática están aumentados en los pacientes que sufren dolor de cabeza tensional (23).

Recientemente se ha comprobado que el óxido nítrico pudiera estar involucrado en la producción de cefalalgias. En las plaquetas de pacientes con dolor de cabeza crónico se encontraron niveles muy elevados de óxido nítrico (24-26).

Sin embargo, el papel de la serotonina en la producción del dolor de cabeza no está muy claro. Como puede verse en los estudios previamente analizados, el contenido de serotonina en las plaquetas es variable según el tipo de dolor, algunos trabajos reportan niveles plasmáticos de serotonina altos o bajos y no se sabe cual es la naturaleza de la conexión entre el metabolismo de la serotonina y el del óxido nítrico en los pacientes que sufren dolor de cabeza. Con el propósito de entender mejor los rasgos clínicos y químicos del dolor de cabeza se emprendió el presente estudio. Fue analizada una muestra de pacientes que asisten al Hospital Tipo I de Coloncito y cuyo motivo de consulta fue el dolor de cabeza. Se les tomaron muestras de plasma y se

analizó el nivel de serotonina así como de varios aminoácidos incluyendo la arginina que es el precursor del óxido nítrico. Se encontraron dos grupos de pacientes según su contenido de serotonina plasmática y una alteración en los niveles plasmáticos de arginina.

MATERIALES, SUJETOS Y MÉTODOS

Se estudiaron 34 pacientes de ambos sexos, cuyas edades estaban comprendidas entre los 13 y los 75 años que padecían cefalalgia y que se presentaron en la emergencia del Hospital Tipo I de Coloncito, estado Táchira, Venezuela.

Para este estudio se contó con la autorización por escrito de estos pacientes.

Muestras

Por venoclisis se les tomó una muestra de 3 cm³ de la vena cubital en un tubo contentivo de heparina. La muestra fue enfriada en hielo y luego centrifugada para separar el plasma de las células sanguíneas. El plasma fue colocado en un tubo *Eppendorf* de polietileno de 400 microlitros de capacidad. Luego fue sometido a diálisis usando el siguiente procedimiento. Se fabricaron cánulas de microdiálisis introduciendo los extremos de una fibra hueca de celulosa cuyo peso molecular de corte era de 13 KD dentro de dos tubos de acero inoxidable 26 gauge. Los extremos del tubo de celulosa fueron fijados en los tubos de acero inoxidable mediante *epoxy* de manera tal que quedaron 2 cm de la fibra de celulosa expuestos. Luego se colocó un alambre de cromo-níquel de 5 milésimas de pulgada de diámetro externo dentro de los tres tubos y finalmente se doblaron los tubos de forma tal que quedó un asa. Uno de los tubos fue conectado a una jeringa mediante un tubo de polietileno calibre 20. La jeringa estaba llena de solución salina fisiológica estéril. La jeringa fue colocada en una bomba y el flujo fue fijado a 1 microlitro por minuto. En el otro tubo de acero inoxidable fue conectado un trozo de tubo de polietileno calibre 20 y de 4 cm de longitud. El asa de diálisis fue introducida en el plasma dentro del tubo *Eppendorf* y se recogió el dializado durante 60 minutos. Este dializado fue congelado hasta su utilización.

Procesamiento de los dializados

Se tomaron 20 microlitros de dializado y fueron inyectados en un cromatógrafo para medir serotonina

y ácido 5-hidroxiindolacético. Se tomó además una alícuota de 10 microlitros y se colocó en un tubo de *Eppendorf* al cual se le añadieron 10 microlitros de una solución preparada mezclando partes iguales de una solución 2,4 mM de fluoresceína disuelta en *buffer* carbonato 20 mM con pH de 9,5 y una solución 2,75 mM de isotiocianato de fluoresceína, isómero I, disuelta en acetona. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 18 horas y luego fue analizada mediante electroforesis capilar en zona y detección mediante fluorescencia inducida por láser.

La cromatografía se realizó en un cromatógrafo equipado con una bomba de doble pistón que impulsaba una fase móvil de acetato a pH 3,5. La fase móvil fue elaborada mezclando 100 mL de NaOH 1 M con 100 mL de ácido monocloroacético 1 M, 200 mg de ácido octanosulfónico y 20 mL de acetonitrilo. La serotonina y el ácido 5-hidroxiindolacético fueron oxidados en un electrodo de carbón vítreo mediante una diferencia de potencial de 700 mV con un electrodo de plata clorurada como electrodo de referencia. El aparato fue calibrado con una solución contentiva de 20 pg/20 microlitros de ambos compuestos. Las concentraciones de serotonina y de ácido 5-hidroxiindolacético fueron medidas comparando las alturas de los picos de las soluciones estándar con la altura de los picos de las sustancias de los dializados.

La electroforesis capilar se realizó en un equipo model R2D2 automático y computarizado fabricado por Meridiálisis CA en Mérida, Venezuela. Este equipo tiene un capilar de 45 cm de longitud efectiva, lleno de *buffer* carbonato 20 mM y con sus extremos inmersos en reservorios equipados con electrodos de platino-iridio. Estos estaban conectados a una fuente de poder que generaba 23 KV. Las muestras derivatizadas eran inyectadas en el extremo anódico del capilar mediante la aplicación de una presión negativa de 12 psi en el extremo catódico del capilar. Luego se aplicaba el alto voltaje y la muestra era corrida durante 15 minutos. Después de separadas las sustancias eran detectadas en un detector colineal que recibía un rayo láser de 488 nm y 10 mW de potencia emanado de un tubo de ion argón. El láser es conducido al detector mediante una fibra óptica, es desviado hacia un objetivo de apertura numérica alta mediante un espejo dicróico centrado a 505 nm. La fluorescencia es recogida por el mismo objetivo, atraviesa el espejo dicróico y es concentrada, mediante un ocular, en la ventana fotosensible de un tubo fotomultiplicador. La señal del tubo

fotomultiplicador es alimentada en un computador equipado con el software Onice. La fluoresceína fue utilizada como un estándar interno que reduce la variabilidad de los picos debida a las variaciones en el procedimiento de inyección.

RESULTADOS

La etiología de las cefaleas se dedujo de la sintomatología de los pacientes (ver Cuadro 1). Se observó que los pacientes se podían dividir en dos grupos según su contenido plasmático de serotonina. En un grupo de 28 pacientes estos niveles estaban comprendidos entre 242 pg/20 microlitros y 1 162 pg/20 microlitros con una media de $533 \pm 49,7$ pg/20 microlitros y otro grupo de 6 pacientes en los que los niveles de serotonina estaban comprendidos entre 14 pg/20 microlitros y 102 pg/20 microlitros y cuya media era de $44,6 \pm 12$ pg/20 microlitros. Así fue posible establecer dos categorías de pacientes. Uno de elevado nivel de serotonina y otro de bajo nivel de serotonina. Estos niveles fueron significativamente distintos desde el punto de vista estadístico cuando fueron analizados mediante test de Student ($P < 0,00001$), (ver Figura 1).

Cuadro 1

Impresión diagnóstica de la etiología de las cefaleas
(Los números corresponden a la cantidad
de pacientes en cada categoría)

Origen de la cefalea	Pacientes con serotonina baja arginina alta	Pacientes con serotonina alta arginina baja
Tensional	1	-
Vascular	1	1
Mixta (vascular +tensional)	1	-
Secundario a enfermedad sistémica	1	5
Síndrome premenstrual	2	-
Contractura muscular	-	16
Tensional + proceso sinusoidal	-	1
Secundaria a proceso oftalmológico	-	1
Secundaria a proceso autoinmune	-	1
Secundaria a proceso infeccioso	-	1
Tensional + síndrome pre-menstrual	-	2

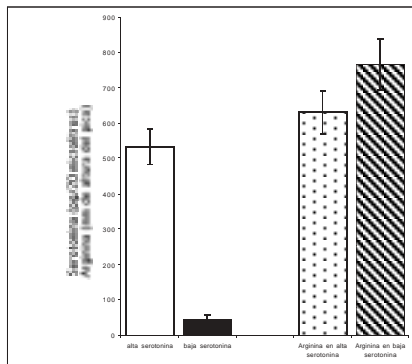


Figura 1. La barra blanca corresponden a los niveles de serotonina en el grupo de pacientes que tenían serotonina plasmática elevada; la barra negra corresponde a los que tenían baja serotonina; la barra punteada corresponde a los niveles de arginina en los pacientes con serotonina elevada y la barra con líneas diagonales corresponde a los niveles de arginina en el grupo de pacientes que tenían serotonina baja.

Las mediciones de aminoácidos mostraron diferencias en la concentración de arginina en las dos poblaciones de pacientes establecidas mediante las concentraciones de serotonina halladas. Los pacientes de alta concentración de serotonina tienen niveles más bajos de arginina (medidas las alturas de los picos son de $671,74 \pm 61$ mm) en comparación con los pacientes que tenían bajo nivel de serotonina cuyo nivel de arginina fue mayor ($P < 0,029$).

Los datos clínicos fueron clasificados por grupos y estos fueron comparados mediante test de Chi cuadrado en los dos grupos previamente establecidos mediante los contenidos plasmáticos de serotonina y arginina. Los pacientes del grupo de alta concentración de serotonina tenían cefalalgia de comienzo en la frente mientras que los del grupo de baja concentración de serotonina tenían el comienzo de la cefalalgia preferencialmente en las sienas. La presencia de náuseas fue significativamente mayor en los pacientes con baja serotonina pero los pacientes del grupo de serotonina alta tenían vómitos con más frecuencia. El dolor era pulsátil y opresivo en los pacientes con baja concentración de serotonina en los dializados de plasma y en ambos grupos de pacientes el dolor se acentuaba al flexionar el cuello.

DISCUSIÓN

Los presentes resultados confirman la hipótesis

según la cual la serotonina y el óxido nítrico juegan un papel muy importante en la producción de cefalalgias. En estos pacientes quedaron claramente establecidos dos grupos según el contenido de serotonina y de arginina de sus plasmas en la fase donde presentan dolor agudo. En publicaciones muy recientes se ha establecido que los pacientes que tienen una gran actividad del sistema del óxido nítrico tienen bajo contenido de serotonina en sus plaquetas. Es posible que la baja serotonina plasmática observada en uno de los grupos de pacientes aquí reportados sea consecuencia de un bajo contenido de serotonina en las plaquetas de dichos pacientes. Al mismo tiempo, el elevado contenido de arginina revela que estos pacientes pueden tener una gran actividad del sistema del óxido nítrico. Efectivamente, la arginina es el precursor del óxido nítrico y se sabe que existe un *pool* de la enzima óxido nítrico sintetasa cuya actividad depende de la disponibilidad de arginina. Este *pool* debe estar más activo en los pacientes que tienen la arginina alta.

Se ha postulado que la elevada concentración de serotonina puede ser la causante de la cefalalgia en algunos pacientes. Esta conjetura se basa en que drogas agonistas de la serotonina como la fluoxetina y la m-clorofenilpiperazina inducen ataques de migraña a través de receptores 5-HT₂ (27) mientras que, como hemos mencionado antes, los antagonistas de los receptores 5-HT₂ son analgésicos en muchos casos de cefalalgia.

Sin embargo, nuestros datos también muestran que la participación de la serotonina en la patogenia del dolor de cabeza es más bien compleja. Además de que hay dos grandes grupos de pacientes desde el punto de vista del sistema serotoninérgico, hay también división según el sistema del óxido nítrico. Es posible que otros marcadores químicos también muestren diferencias y si se descubren se puede establecer una clasificación de las cefalalgias basada en el cuadro químico de los pacientes y esto quizás pueda ayudar a establecer tratamientos más efectivos.

REFERENCIAS

1. Bono G, Micieli G, Sances G, Calvani M, Nappi G. L-5HTP treatment in primary headaches: An attempt at clinical identification of responsive patients. *Cephalalgia*. 1984;4:159-165.
2. De Benedittis G, Massei R. Serotonin precursors in chronic primary headache. A double-blind cross-over

IMPRESIÓN DIAGNÓSTICA DE LA ETIOLOGÍA DE LAS CEFALEAS

- study with L-5-hydroxytryptophan vs. placebo. *J Neurosurg Sci.* 1985;29:239-248.
3. Tsuji M, Iida H. Treatment of headache with antidepressant. *Folia Psychiatr Neurol Jpn.* 1984;38:143-149.
 4. Clifford DB. Treatment of pain with antidepressants. *Am Fam Physician.* 1985;31:181-185.
 5. Sjaastad O. So-called "tension headache"—the response to a 5-HT uptake inhibitor: Femoxetine. *Cephalalgia.* 1983;3:53-60.
 6. Nicolodi M, Sicuteri F. Links between headache mechanisms and new medications. *Clin J Pain.* 1991;7:64-71.
 7. Manna V, Bolino F, Di Cicco L. Chronic tension-type headache, mood depression and serotonin: Therapeutic effects of fluvoxamine and mianserine. *Headache.* 1994;34:44-49.
 8. Nappi G, Sandrini G, Granella F, Ruiz L, Cerutti G, Facchinetti F, et al. A new 5-HT₂ antagonist (ritanserine) in the treatment of chronic headache with depression. A double-blind study vs amitriptyline. *Headache.* 1990;30:439-444.
 9. Silberstein SD. Advances in understanding the pathophysiology of headache. *Neurology.* 1992;42:6-10.
 10. Humphrey PP, Feniuk W, Watts AD. Prejunctional effects of 5-hydroxytryptamine on noradrenergic nerves in the cardiovascular system. *Fed Proc.* 1983;42:218-222.
 11. Humphrey PP, Feniuk W, Perren MJ, Connor HE, Oxford AW, Coates LH, et al. GR43175, a selective agonist for the 5-HT₁-like receptor in dog isolated saphenous vein. *Br J Pharmacol.* 1988;94:1123-1132.
 12. Humphrey PP, Feniuk W, Perren MJ, Connor HE, Oxford AW. The pharmacology of the novel 5-HT₁-like receptor agonist, GR43175. *Cephalalgia.* 1989;9:23-33.
 13. Bussone G, Giovannini P, Boiardi A, Boeri R. A study of the activity of platelet monoamine oxidase in patients with migraine headaches or with 'cluster headaches'. *Eur Neurol.* 1977;157-162.
 14. Giacobozzo M, Bernoni RM, Di Sabato F, Martelletti P. Impairment of 5HT binding to lymphocytes and monocytes from tension-type headache patients. *Headache.* 1990;30:220-223.
 15. Marazziti D, Bonuccelli U, Nuti A, Toni C, Pedri S, Palego L, et al. Platelet 3H-imipramine binding and sulphotransferase activity in primary headache. *Cephalalgia.* 1994;14:210-214.
 16. Lance JW. Headache: Classification, mechanism and principles of therapy, with particular reference to migraine. *Recent Prog Med.* 1989;80:673-680.
 17. Ferrari MD, Odink J, Tapparelli C, Van Kempen GM, Pennings EJ, Bruyn GW. Serotonin metabolism in migraine. *Neurology.* 1989;39:1239-1242.
 18. Anthony M, Lance JW. Plasma serotonin in patients with chronic tension headaches. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1989;52:182-184.
 19. Nakano T, Shimomura T, Takahashi K, Ikawa S. Platelet substance P and 5-hydroxytryptamine in migraine and tension-type headache. *Headache.* 1993;33:528-532.
 20. Shimomura T, Takahashi K. Alteration of platelet serotonin in patients with chronic tension-type headache during cold pressor test. *Headache.* 1990;30:581-583.
 21. D'Andrea G, Hasselmark L, Alecci M, Perini F, Welch KM. Increased platelet serotonin content and hypersecretion from dense and alpha-granules in vitro in tension-type headache. *Cephalalgia.* 1993;13:349-353.
 22. Leira R, Castillo J, Martinez F, Prieto JM, Noya M. Platelet-rich plasma serotonin levels in tension-type headache and depression. *Cephalalgia.* 1993;13:346-348.
 23. Jensen R, Hindberg I. Plasma serotonin increase during episodes of tension-type headache. *Cephalalgia.* 1994;14:219-222.
 24. Sarchielli P, Alberti A, Russo S, Codini M, Panico R, Floridi A, et al. Nitric oxide pathway, Ca²⁺, and serotonin content in platelets from patients suffering from chronic daily headache. *Cephalalgia.* 1999;19:810-816.
 25. Sarchielli P, Alberti A, Codini M, Floridi A, Gallai V. Nitric oxide metabolites, prostaglandins and trigeminal vasoactive peptides in internal jugular vein blood during spontaneous migraine attacks. *Cephalalgia.* 2000;20:907-918.
 26. Sarchielli P, Alberti A, Floridi A, Gallai V. Arginine/nitric oxide pathway in chronic tension-type headache: Relation with serotonin content and secretion and glutamate content. *J Neurol Sci.* 2002;198:9-15.
 27. Panconesi A, Sicuteri R. Headache induced by serotonergic agonists—a key to the interpretation of migraine pathogenesis? *Cephalalgia.* 1997;17:3-14.

Dirección de Correspondencia:

Betty Martínez

bettymartinez47@hotmail.com

hernande@ula.ve

Apartado de correos # 109

Mérida, 5101-A, Venezuela