

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 294**

51 Int. Cl.:

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2017** **PCT/US2017/068698**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2018** **WO18125999**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2017** **E 17887010 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024** **EP 3506892**

54 Título: **Secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar**

30 Prioridad:

28.12.2016 US 201662439772 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2024

73 Titular/es:

VANDERBILT UNIVERSITY (100.0%)
305 Kirkland Hall 2201 West End Avenue
Nashville, TN 37240, US

72 Inventor/es:

SUMMAR, MARSHALL y
BARR, FREDERICK

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 980 294 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar

5 **Campo de la Invención**

La presente invención hace referencia, en términos generales, al campo del mantenimiento del acoplamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés) para reducir la incidencia o gravedad de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar debida a la formación de radicales libres en un paciente durante el baipás cardiopulmonar, que comprende administrar una cantidad eficaz de citrulina al paciente.

Antecedentes de la Invención

Secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar

En el período posoperatorio inmediato, los niños que han sido sometidos a cirugía para reparar una lesión cardíaca congénita son muy vulnerables a un aumento repentino o sostenido de la resistencia vascular pulmonar. Tras la cirugía, la reactividad de la vasculatura pulmonar aumenta de manera que los estímulos vasoespásticos pueden producir aumentos repentinos en la resistencia y presión arterial pulmonar. Estos a su vez pueden conducir a insuficiencia cardíaca derecha aguda, regurgitación tricúspidea, hipotensión sistémica, isquemia de miocardio y resistencia de las vías respiratorias aumentada. En su forma completa, tales crisis de hipertensión pulmonar pueden ser letales. Eventos estimulantes más leves pueden precipitar crisis más leves que duran más y se acumulan, lo cual conduce a estadias prolongadas en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Adatia & Beghetti (2009) *Cardiol Young* 19(4): 315–319.

La lesión inducida por baipás cardiopulmonar (BCP) resulta de una respuesta inflamatoria sistémica principalmente humoral inducida por el proceso de baipás. Seghaye (2003) *Cardiol Young* 13(3): 228–239; Day & Taylor (2005) *Int J Surg* 3(2): 129–140; Jagers & Lawson (2006) *Ann Thorac Surg* 81(6): S2360–2366; Kozik & Tweddell (2006) *Ann Thorac Surg* 81(6): S2347–2354; Warren *et al.* (2009) *J Cardiothorac Vasc Anesth* 23(2): 223–231; Warren *et al.* (2009) *J Cardiothorac Vasc Anesth* 23(3): 384–393. El daño sufrido por el pulmón y otros tejidos da como resultado la afección clínica grave descrita en la presente.

Proporción de niños sometidos a BCP que desarrollan secuelas de lesión pulmonar por BCP.

Alrededor de un quinto a un tercio de los pacientes menores sometidos a baipás cardiopulmonar sufren secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar. La hipertensión pulmonar postoperatoria aguda se considera un elemento clave indicador de secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar. Russell proporciona criterios para la hipertensión pulmonar clínicamente significativa como: (A) donde la presión arterial pulmonar media era $\geq 50\%$ de la presión arterial sistémica media; o (B) donde los datos ecocardiográficos indicaban un grado similar de hipertensión pulmonar. Russell *et al.* (1998) *Anesth Analg* 87(1): 46–51. Esto resultó en una cifra de 13 de 36, o 36% de pacientes sometidos a cirugía de reparación cardíaca congénita que sufrieron secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar.

En otro enfoque, Lindberg se enfocó en la hipertensión pulmonar grave al definir la hipertensión pulmonar postoperatoria grave como una presión arterial pulmonar media igual o superior al nivel de presión arterial sistémica media. Lindberg *et al.* (2002) *J Thorac Cardiovasc Surg* 123(6): 1155–1163. En general, 2% de 1349 pacientes en su población cumplían este riguroso criterio. Lindberg aborda la presencia de casos moderados de hipertensión pulmonar, pero no los cuantificó específicamente. Sin embargo, los pacientes que calificaron para una evaluación clínica completa tuvieron un catéter arterial pulmonar en la UCI, pasaron más de cuatro días con ventilación mecánica, o murieron. Estos pacientes, que probablemente tenían hipertensión pulmonar clínicamente significativa, totalizaron una cantidad de 224, que representa el 17% de la población. *Id.*

Varios estudios citan cifras similares. Bando menciona que alrededor de 30% de pacientes históricamente desarrollaron hipertensión pulmonar aunque observa una disminución más reciente, sin embargo, los datos en el documento sugieren una tasa de alrededor del 17%. Bando *et al.* (1996) *J Thorac Cardiovasc Surg* 112(6): 1600–1607. Checchia señaló que la incidencia exacta de hipertensión pulmonar en niños sometidos a cirugía cardíaca aún no está clara. Checchia *et al.* (2012) *Pediatr Cardiol* 33(4): 493–505. Checchia observó solo un estudio en el que 11 de 20 lactantes desarrollaron hipertensión pulmonar postoperatoria; cuando también se incluyeron casos de hipertensión pulmonar episódica, la proporción aumentó a 75%. *Id.*

Destino de los niños que desarrollan hipertensión pulmonar postoperatoria

Un estudio realizado por Brown examinó el destino de los niños que desarrollan hipertensión pulmonar postoperatoria y lo enmarcó en términos clínicos y económicamente importantes. Todos los posibles factores de riesgo para la duración de la estadia se examinaron en varios modelos multivariados. Los factores más fuertes, incluida la hipertensión pulmonar, se combinaron en una puntuación de complicaciones. Tanto en el modelo postoperatorio como en el modelo final como parte de la puntuación de complicaciones, la hipertensión pulmonar fue un fuerte predictor de duración

prolongada de estadía. La duración prolongada de estadía tiene importantes consecuencias económicas. Los niños que cayeron por encima del percentil 95 por la duración de la estadía representaron el 30% de los días cama con tres veces la mortalidad de los niños por debajo del percentil 95. En un centro, 7.1% de los pacientes usaron 50.1% de los días de cuidados intensivos totales y 47.7% de los recursos tecnológicos totales. En particular, 12% de los pacientes requirieron estadías en UCI de 14 días o más. Para todos los pacientes, la mediana de la estadía fue de 3 días. En cambio, la mediana de la estadía en UCI para pacientes en el percentil 95 o por encima de este fue de 27 días. De acuerdo con esto, la duración media de la ventilación mecánica para pacientes en el percentil 95 o por encima de éste fue de 23 días. Brown *et al.* (2003) *Crit Care Med* 31(1): 28-33.

Terapias actuales para secuelas de lesión pulmonar inducida por BCP

Landis proporcionó una reseña basada en pruebas de las diversas estrategias en uso para tratar hipertensión pulmonar postoperatoria en baipás pulmonar en adultos, concluyendo que solamente el óxido nítrico inhalado y posiblemente inhibidores del complemento proporcionan algún valor real. Landis *et al.* (2014) *J Extra Corpor Technol* 46(3): 197-211. Otros estudios se han enfocado en la cirugía cardíaca pediátrica. Apostolakis *et al.* (2010) *J Cardiothorac Surg* 5: 1; Barst *et al.* (2010) *Pediatr Cardiol* 31(5): 598-606; Fraisse & Wessel (2010) *Pediatr Crit Care Med* 11(2 Suppl): S37-40; Taylor y Laussen (2010) *Pediatr Crit Care Med* 11(2 Suppl): S27-29; Bronicki & Chang (2011) *Crit Care Med* 39(8): 1974-1984; Fraisse *et al.* (2011) *Intensive Care Med* 37(3): 502-509; Checchia *et al.* (2012) *Pediatr Cardiol* 33(4): 493-505; Brunner *et al.* (2014) *Pulm Circ* 4(1): 10-24. La base de la terapia actual sigue siendo el óxido nítrico inhalado (iNO). El óxido nítrico, como la mayoría de las otras terapias, es una terapia reactiva que primero requiere que un paciente desarrolle las complicaciones respiratorias de un baipás cardiopulmonar antes de que pueda iniciarse la terapia. Asimismo, el óxido nítrico inhalado tiene dos inconvenientes principales; (A) el óxido nítrico inhalado tiene un marcado fenómeno de rebote cuando se suspende; y (B) cuando el óxido nítrico forma complejo con la hemoglobina, conduce a la metahemoglobinemia. Aunque se han usado los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 tales como sildenafil para mitigar el rebote del óxido nítrico inhalado, los resultados no han sido uniformes.

Por consiguiente, existe en la técnica una necesidad de un método más eficaz para reducir las secuelas de lesión pulmonar inducida por BCP en un paciente durante la cirugía y después de la cirugía.

Breve Descripción de la Invención

La presente invención proporciona un método para mantener el acoplamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) para reducir la incidencia o gravedad de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar debida a la formación de radicales libres en un paciente durante el baipás cardiopulmonar, que comprende administrar una cantidad eficaz de citrulina al paciente. La cantidad eficaz de citrulina puede administrarse al paciente durante o después de la cirugía. La cantidad eficaz de citrulina puede administrarse al paciente durante y después de la cirugía. La cantidad eficaz de citrulina puede administrarse al paciente antes, durante y después de la cirugía.

En muchas modalidades, la cantidad eficaz de citrulina puede ser una cantidad suficiente para reducir el desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). En muchas modalidades, la cantidad eficaz de citrulina puede ser una cantidad suficiente para reducir la formación de radicales libres. En muchas modalidades, la cantidad eficaz de citrulina puede ser una cantidad suficiente para reducir la incidencia o gravedad de la lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar. En muchas modalidades, la citrulina puede administrarse al paciente antes de la cirugía. En muchas modalidades, la citrulina puede administrarse alrededor de 12 horas antes de la cirugía. En muchas modalidades, la citrulina puede administrarse al paciente al comienzo de la cirugía. En muchas modalidades, la citrulina puede administrarse al paciente durante la cirugía. En muchas modalidades, la citrulina puede administrarse al paciente después de la cirugía.

Este método puede usarse cuando la cirugía puede ser para corregir un defecto cardíaco. Este método puede usarse cuando el defecto cardíaco puede asociarse con exceso de flujo sanguíneo pulmonar. En modalidades particulares, el defecto cardíaco puede ser una comunicación interauricular. En modalidades particulares, la comunicación interauricular puede ser una comunicación interauricular grande. En modalidades particulares, el defecto cardíaco puede ser una comunicación interventricular. En modalidades particulares, la comunicación interventricular puede ser una comunicación interventricular (VSD, por sus siglas en inglés) no restrictiva grande. En modalidades particulares, el defecto cardíaco puede ser una lesión de ventrículo único. En modalidades particulares, la lesión de ventrículo único puede repararse mediante los procedimientos de Glenn y Fontan. En muchas modalidades, el defecto cardíaco puede ser Estenosis de la Válvula Aórtica (AVS, por sus siglas en inglés), Comunicación Interauricular (ASD, por sus siglas en inglés), Coartación de la Aorta (CoA), defecto del Canal Auriculoventricular Completo (CAVC), d-Transposición de las grandes arterias, Anomalia de Ebstein, l-transposición de las grandes arterias, Conducto Arterioso Persistente (PDA, por sus siglas en inglés), Estenosis de la Válvula Pulmonar, Defectos del Ventrículo Único, Tetralogía de Fallot, Conexión Venosa Pulmonar Anómala Total (TAPVC, por sus siglas en inglés), Tronco Arterioso o Comunicación Interventricular (VSD). En modalidades particulares, la cirugía puede ser un procedimiento de cambio arterial. En modalidades particulares, el baipás cardiopulmonar puede ser para reparar una comunicación auriculoventricular (AVSD, por sus siglas en inglés) parcial o completa. En modalidades particulares, el baipás cardiopulmonar puede ser para reparar una comunicación interauricular del *ostium primum* (ASD primum).

- La citrulina puede administrarse al comienzo de la cirugía y puede ser alrededor de 100–500 mg/kg de citrulina. Preferentemente, el bolo de citrulina al comienzo de la cirugía puede ser de alrededor de 100-300 mg/kg de citrulina. Preferentemente, el bolo de citrulina al comienzo de la cirugía puede ser alrededor de 150 mg/kg de citrulina.
- 5 Preferentemente, la citrulina se administra al comienzo de la cirugía y puede ser de alrededor de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 mg/kg de citrulina. Preferentemente, la citrulina administrada durante la cirugía puede agregarse a la filtración. Más preferentemente, la citrulina administrada durante la cirugía puede agregarse al fluido de reemplazo de hemoconcentración.
- 10 En muchas modalidades, la citrulina puede agregarse a alrededor de 100–500 $\mu\text{mol/l}$. En muchas modalidades, la citrulina puede agregarse a alrededor de 100-300 $\mu\text{mol/l}$. En muchas modalidades, la citrulina puede agregarse a alrededor de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 $\mu\text{mol/l}$. En muchas modalidades, la citrulina puede agregarse a alrededor de 200 $\mu\text{mol/l}$.
- 15 Un bolo de citrulina puede administrarse alrededor de 5-60 minutos después de la cirugía. En muchas modalidades, el bolo de citrulina puede administrarse alrededor de 15-45 minutos después de la cirugía. En muchas modalidades, el bolo de citrulina puede administrarse alrededor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 minutos después de la cirugía. En muchas modalidades, un bolo de citrulina puede administrarse alrededor de 30 minutos después de la cirugía.
- 20 En muchas modalidades, el bolo de citrulina puede ser alrededor de 5–50 mg/kg de citrulina. En muchas modalidades, el bolo de citrulina puede ser alrededor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 mg/kg de citrulina. En modalidades particulares, el bolo de citrulina puede ser alrededor de 20 mg/kg de citrulina.
- 25 El bolo de citrulina puede administrarse alrededor de 30 minutos después de la decanulación del baipás cardiopulmonar.
- En muchas modalidades, la citrulina puede administrarse al paciente durante alrededor de 12–48 después de la cirugía. En muchas modalidades, la citrulina puede administrarse al paciente durante alrededor de 12, 24, 36 o 48 horas después de la cirugía. En muchas modalidades, la citrulina posterior a la cirugía puede infundirse al paciente durante alrededor de 48 horas. En muchas modalidades, la citrulina puede administrarse mediante infusión a alrededor de 3–12 mg/kg/hora. En muchas modalidades, la citrulina puede administrarse mediante infusión a alrededor de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 mg/kg/hora. En muchas modalidades, la infusión puede ser alrededor de 9 mg/kg/hora.
- 30 En muchas modalidades, la citrulina puede administrarse de forma intravenosa. En muchas modalidades, la citrulina puede administrarse de forma perioperatoria. En muchas modalidades, un bolo de citrulina puede administrarse al principio del procedimiento quirúrgico.
- 35 En muchas modalidades, la citrulina puede administrarse de forma oral, intravenosa, por inhalación o una combinación de éstas.
- 40 En muchas modalidades, el bolo de citrulina puede ser alrededor de 150 mg/kg.
- En muchas modalidades, la citrulina puede agregarse a alrededor de 200 $\mu\text{mol/l}$ al fluido de hemoconcentración y filtración usado durante la cirugía.
- 45 En muchas modalidades, un bolo de alrededor de 20 mg/kg de citrulina puede administrarse después de la decanulación del baipás cardiopulmonar.
- 50 En muchas modalidades, después de la decanulación del baipás cardiopulmonar, se puede administrar una infusión continua de 9 mg/kg/h de citrulina, opcionalmente, durante alrededor de 48 horas.
- En muchas modalidades, puede administrarse un bolo de 150 mg/kg de citrulina al principio de la cirugía, seguido de una infusión continua de 9 mg/kg/hora de citrulina 4 horas después de la cirugía.
- 55 En muchas modalidades, el paciente puede tener un genotipo T1405N en el gen de CPSI de CC, AC, AA o una combinación de éstos. En modalidades particulares, el paciente puede tener un genotipo T1405N en el gen de CPSI de CC.
- 60 En muchas modalidades, el nivel de citrulina en plasma del paciente puede elevarse por encima de alrededor de 37, 50, 100, 150 o 200 $\mu\text{mol/l}$. En muchas modalidades, el nivel de citrulina en plasma del paciente puede elevarse por encima de alrededor de 37, 50, 100, 150 o 200 $\mu\text{mol/l}$ después de la cirugía. En muchas modalidades, el nivel de citrulina en plasma del paciente puede elevarse por encima de alrededor de 100 $\mu\text{mol/l}$. En muchas modalidades, el nivel de citrulina en plasma del paciente puede elevarse por encima de alrededor de 100 $\mu\text{mol/l}$ después de la cirugía.
- 65 En muchas modalidades, el nivel de citrulina en plasma del paciente puede elevarse a alrededor de 37–200 $\mu\text{mol/l}$ después de la cirugía, preferentemente 100–200 $\mu\text{mol/l}$ después de la cirugía. En muchas modalidades, el nivel de

citrulina en plasma del paciente puede elevarse a alrededor de 37 $\mu\text{mol/l}$ a 2.5 mM. En muchas modalidades, el nivel de citrulina en plasma del paciente puede elevarse a entre alrededor de 37 $\mu\text{mol/l}$ a 200 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ a 1 mM/l, 150 $\mu\text{mol/l}$ a 500 $\mu\text{mol/l}$.

5 En una modalidad particular, el nivel de citrulina en plasma del paciente puede elevarse durante al menor 12–48 horas después de la cirugía. En muchas modalidades, el nivel de citrulina en plasma del paciente puede elevarse por más de 48 horas después de la cirugía.

10 En modalidades particulares, el paciente puede ser un neonato, preadolescente, adolescente o un adulto. En muchas modalidades, el paciente puede tener menos de alrededor de 6 años. En muchas modalidades, el paciente puede tener menos de alrededor de 10 días de edad. En muchas modalidades, el paciente puede ser un lactante prematuro.

15 En muchas modalidades, la estadía del paciente en la unidad de cuidados intensivos (UCI) puede reducirse, preferentemente menos de 27 días.

En muchas modalidades, el paciente puede estar en riesgo de insuficiencia cardíaca derecha aguda, regurgitación tricúspide, hipotensión sistémica, isquemia de miocardio y resistencia de las vías respiratorias aumentada.

20 En muchas modalidades, el paciente puede estar en riesgo de hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (PPHN, por sus siglas en inglés).

En muchas modalidades, la cantidad eficaz de citrulina puede ser suficiente para impedir el desacoplamiento de eNOS.

25 En muchas modalidades, el paciente puede estar en riesgo de lesión pulmonar aguda. En una modalidad particular, el paciente puede tener lesión pulmonar aguda.

En muchas modalidades, el paciente puede estar en riesgo de hipertensión pulmonar postoperatoria. En una modalidad particular, el paciente puede tener hipertensión pulmonar postoperatoria.

30 En muchas modalidades, el método puede reducir la incidencia de secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar en pacientes durante la cirugía de baipás cardiopulmonar y después de la cirugía.

35 En muchas modalidades del método de esta invención, el método puede reducir la gravedad de secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar en pacientes durante la cirugía de baipás cardiopulmonar y después de la cirugía.

Breve Descripción de las Figuras

40 La **Figura 1** ilustra el ciclo de la urea hepático.

La **Figura 2** ilustra el efecto del genotipo de los polimorfismos de CPSI (CC, AC y AA) en los niveles de citrulina y arginina en plasma. Estos son polimorfismos de CPSI que resultan en el genotipo T1405N.

45 La **Figura 3** ilustra un diagrama de flujo de un protocolo de ejemplo para el tratamiento de secuelas de lesión pulmonar inducida por BCP en un paciente durante la cirugía y después de la cirugía.

La **Figura 4** ilustra la reducción de NO y precursores de NO, arginina y citrulina, en pacientes con hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (PPHN).

50 La **Figura 5** ilustra la reducción de los niveles de arginina en plasma a partir del baipás cardiopulmonar (baipás CP). El baipás CP reduce los niveles de arginina en plasma de un paciente.

55 Las **Figuras 6A-6B** ilustran la reducción de los niveles de citrulina en plasma (Figura 6A) y suero (Figura 6B) a partir del baipás cardiopulmonar. El baipás CP reduce los niveles citrulina en suero y plasma de un paciente.

La **Figura 7** ilustra la reducción de los niveles de óxido nítrico (NO) en plasma a partir del baipás cardiopulmonar. El baipás CP reduce los niveles de NO en plasma.

60 La **Figura 8** ilustra la reducción de los niveles de arginina en pacientes con y sin aumento de tono vascular pulmonar (PVT– y PVT+) antes de la cirugía, después de la cirugía y 12, 24 y 48 horas después de la cirugía.

65 Las **Figuras 9A-9C** ilustran los niveles de citrulina en plasma en pacientes con y sin administración de un bolo de citrulina. La Figura 9A ilustra la media para los Pacientes 6 y 8. La Figura 9B ilustra la media para los Pacientes 9 y 10. La Figura 9C ilustra la media para los Pacientes 13–16. Los pacientes recibieron una dosis de citrulina (50, 100 o 150 mg/kg) antes de la cirugía y después de la cirugía.

Las **Figuras 10A-10B** ilustran un modelo PK (Figura 10A) y parámetros PK (Figura 10B).

Las **Figuras 11A-11B** ilustran los niveles medios de citrulina y arginina en lactantes con y sin la administración de citrulina intravenosa («citrulina IV») durante 60 horas. La Figura 11A ilustra la disminución en los niveles medios de citrulina en lactantes durante 60 horas. La Figura 11B ilustra la disminución en los niveles medios de arginina en lactantes durante 60 horas.

La **Figura 12** ilustra los niveles de citrulina en plasma en pacientes a los que se les administró una dosis de citrulina (50, 100 o 150 mg/kg) después de la cirugía durante 12 horas.

La **Figura 13** ilustra los niveles de citrulina en plasma en pacientes a los que se les administró una dosis de citrulina (50, 100 o 150 mg/kg) después de la cirugía combinada con una infusión intravenosa de citrulina (9 mg/kg/hora) durante 16 horas.

Las **Figuras 14A-14B** ilustran los niveles medios de citrulina en lactantes durante 60 horas (Figura 14A) y los niveles medios de citrulina de nueve lactantes individuales durante 60 horas (Figura 14B).

La **Figura 15** ilustra la duración de la ventilación postoperatoria con diferentes dosis de citrulina.

La **Figura 16** ilustra el efecto de citrulina en el rendimiento respiratorio en la cirugía de reparación de defectos cardíacos congénitos. NB: un único punto de datos está por fuera de los límites de eje (placebo, 672 horas). $P = 0.1911$ prueba t de Satterhwaite, $n = 20$ pacientes usables.

La **Figura 17** ilustra el índice inotrópico medio de pacientes tratados que reciben citrulina (citrulina) contra aquellos sin citrulina (placebo).

Las **Figuras 18A-18B** ilustran la presión sanguínea sistólica y diastólica y la presión arterial media de pacientes que reciben citrulina (citrulina) contra aquellos sin citrulina (placebo). La Figura 18A ilustra la presión sanguínea sistólica y diastólica. No hubo cambios significativos en la presión sanguínea sistólica y diastólica de pacientes que reciben citrulina. La Figura 18B ilustra la presión arterial media de pacientes que reciben citrulina (citrulina) contra aquellos sin citrulina (placebo). No hubo cambios significativos en la presión arterial media de pacientes que reciben citrulina.

La **Figura 19** ilustra la mediana de niveles de citrulina en plasma en pacientes que reciben bolo preoperatorio, citrulina perioperatoria y postoperatoria.

La **Figura 20** es el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de la duración de la ventilación mecánica invasiva desde la finalización de la cirugía hasta la última extubación. (Excluye la reintubación, censurada). Los pacientes que reciben citrulina mostraron una duración reducida de ventilación mecánica. Las diferencias en la ventilación mecánica fueron estadísticamente significativas mediante la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon ($p = 0.0222$) y mediante el análisis ANOVA ($p = 0.0317$).

La **Figura 21** ilustra un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de la duración de tiempo con inotrópicos. Análisis univariado (valor p): prueba de suma de intervalos de Wilcoxon (0.0727), prueba t (0.097).

La **Figura 22** ilustra un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de la duración de tiempo con inotrópicos. Análisis univariado (valor p): prueba de suma de intervalos de Wilcoxon (0.0727), prueba t (0.0987).

La **Figura 23** ilustra una comparación de producción de óxido nítrico (NO) en células endoteliales por arginina, citrulina e histamina. La arginina no es equivalente a la citrulina en la producción de NO.

La **Figura 24A-24B** ilustran la mediana de los niveles de arginina en plasma (Figura 24A) y la mediana de los niveles de óxido nítrico (NO) en plasma (Figura 24B) en pacientes que reciben un placebo y citrulina.

Las **Figuras 25A-25B** ilustran la duración de la ventilación mecánica invasiva en pacientes que reciben un placebo y citrulina con tiempo de reintubación incluido. Figura 25A la duración de la ventilación mecánica postoperatoria para estos pacientes se estableció en cero y todos los pacientes con tiempo de ventilación cero se censuraron. En la Figura 25B, los pacientes con tiempo de ventilación cero no se censuraron. Ambos análisis muestran disminución estadísticamente significativa en el tiempo con ventilación mecánica invasiva para pacientes que reciben citrulina.

Las **Figuras 26A-26B** ilustran la duración de ventilación mecánica invasiva (excluido el tiempo de reintubación) en un paciente. Los resultados confirman un efecto beneficioso de la citrulina en comparación con el tratamiento con placebo en una disminución estadísticamente significativa en el tiempo con ventilación mecánica invasiva.

Las **Figuras 27A-27B** ilustran gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier que muestran una disminución en la necesidad de respiración asistida en pacientes que reciben citrulina en comparación con un placebo.

Las **Figuras 28A-28B** ilustran un análisis de Kaplan-Meier (que omite pacientes con duración cero de uso de inotrópico intravenoso (i.v.)). En la Figura 28A no tienen ninguna censura adicional y en la Figura 28B tienen cero censurado. Las Figuras 28A-28B muestran que los pacientes que reciben citrulina tienen un índice inotrópico inferior que los pacientes que reciben un placebo.

La **Figura 29** ilustra los índices inotrópicos medios en el transcurso del tiempo, que comparan pacientes que recibieron un placebo contra citrulina.

Las **Figuras 30A-30B** ilustran gráficas de Kaplan-Meier para la duración total de medicamentos vasoactivos para la censura de todos los pacientes (Figura 30A) y para pacientes sin el uso de medicamentos vasoactivos censurados (Figura 30B).

La **Figura 31** ilustra la duración total de estadía en unidad de cuidados intensivos pediátricos (UCIP) para pacientes que reciben citrulina contra placebo.

Las **Figuras 32A-32B** ilustran la duración total de estadía en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) basada en la duración más larga de la ventilación mecánica, el uso de inotrópicos i.v. o el uso de vasodilatadores. La Figura 32A ilustra todos los pacientes sin censura adicional. La Figura 32B ilustra todos los pacientes con reintubación excluida y sin censura adicional.

Las **Figuras 33A-33B** ilustran que el criterio de valoración compuesto es la duración máxima de la duración de ventilación mecánica y la duración de uso de inotrópicos. La Figura 33A ilustra todos los pacientes con reintubación incluida y sin censura adicional. La Figura 33B ilustra todos los pacientes con reintubación excluida sin censura adicional. El valor compuesto se censuró si la duración del uso de inotrópicos era 48 horas y la ventilación mecánica más corta que 48 horas.

Descripción Detallada de la Invención

La invención proporciona la reducción de las secuelas de la lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar en pacientes durante la cirugía de baipás cardiopulmonar y después de la cirugía al mantener los niveles de citrulina en plasma. Se puede lograr un nivel de citrulina en plasma perioperatorio sostenido $>37 \mu\text{mol/l}$ por hasta 48 horas después de la cirugía mediante los métodos descritos en la presente. Preferentemente, se puede lograr un nivel de citrulina en plasma perioperatorio sostenido $>100 \mu\text{mol/l}$ por hasta 48 horas después de la cirugía mediante los métodos descritos en la presente. Esto reducirá la incidencia y/o gravedad de secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar en pacientes durante la cirugía de baipás cardiopulmonar y después de la cirugía.

Los inventores descubrieron de manera sorprendente que la complementación de citrulina intravenosa aumenta los niveles de arginina en plasma postoperatorios y previene secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar al reducir el desacoplamiento de eNOS. Reducir la incidencia y/o gravedad de las secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar en pacientes durante la cirugía de baipás cardiopulmonar y después de la cirugía reduce costos y libera personal y equipos para otros usos. Los métodos descritos en la presente usan citrulina intravenosa para la prevención de secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar en pacientes pediátricos que se someten a cirugía por defectos cardíacos congénitos.

El baipás cardiopulmonar causa una respuesta inflamatoria sistémica caracterizada clínicamente por el compromiso agudo de la función cardiovascular y pulmonar. Apostolakis *et al.* (2010) *Journal of Cardiac Surgery* 25(1): 47–55; Huffmyer y Groves (2015) «Pulmonary Complications of Cardiopulmonary Bypass». *Best Practice & Research Clinical Anesthesiology*. Sin embargo, por una cantidad de razones médicas y fisiológicas, los pacientes pediátricos sometidos a BCP durante la reparación quirúrgica de defectos cardíacos congénitos son más susceptibles a esta cascada y a un riesgo médico mayor por su causa que los pacientes adultos. Kozik & Tweddell (2006) *The Annals of Thoracic Surgery* 81(6): S2347–S2354; Shekerdemian (2009) *Heart* 95(15): 1286–1296; Schure (2010) *Southern African Journal of Anesthesia and Analgesia* 16(1): 46–51. Se puede usar la reducción de manifestaciones claves de lesión pulmonar aguda inducida por BCP, a saber, la necesidad postoperatoria de ventilación mecánica y de terapia con inotrópicos para medir la efectividad clínica.

Daño oxidativo debido a eNOS desacoplado

El inventor ha observado que cuando se somete a un paciente a baipás cardiopulmonar (BCP, por sus siglas en inglés), se induce a una respuesta inflamatoria sistémica debida una caída en los niveles de citrulina en plasma. Esta caída de la citrulina en plasma conduce al desacoplamiento de eNOS y la producción de especies de oxígeno radical. El daño oxidativo resultante conduce a lesión pulmonar asociada a BCP.

Múltiples estudios de observación y clínicos han mostrado que los niveles de citrulina y arginina en plasma caen precipitadamente y no se recuperan por hasta 48 horas después del baipás cardiopulmonar para la cirugía cardíaca congénita. Debido a los mecanismos de transporte y el procesamiento intracelular, la citrulina es el sustrato

fundamental para la producción endógena de óxido nítrico. Barr *et al.* (2003) *The Journal of Pediatrics* 142(1): 26–30; Smith *et al.* (2006) *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 132(1): 58–65; Barr *et al.* (2007) *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 134(2): 319–326.

La óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) es un dímero cuando es completamente funcional, *p. ej.*, cuando convierte arginina en óxido nítrico (NO) y citrulina. Mantener la forma de dímero de eNOS requiere un nivel eficaz de citrulina. Cuando la citrulina cae por debajo de un nivel umbral, el dímero eNOS se desacopla. El eNOS desacoplado aún se une al sustrato, pero produce radicales libres, en lugar de NO. Los radicales libres contribuyen al daño de inflamación, que conduce a las secuelas de lesión por baipás cardiopulmonar. La escasa producción de NO por eNOS desacoplado conduce a mayor resistencia vascular pulmonar, promoviendo de ese modo la hipertensión pulmonar.

La fisiopatología de secuelas de lesión pulmonar después de la reparación de diversos defectos cardíacos congénitos implica una caída en los niveles de citrulina en plasma (por debajo de, *p.ej.*, 37 $\mu\text{mol/l}$) que a su vez conduce a un desacoplamiento de la enzima eNOS. La enzima eNOS desacoplada produce radicales de oxígeno que producen daño oxidativo subyacente a la lesión pulmonar que puede ser parte de las secuelas después del baipás cardiopulmonar. La paradoja de la arginina es clínicamente significativa, porque la arginina no puede servir para prevenir el desacoplamiento de eNOS y la consiguiente prevención del daño oxidativo debido a eNOS desacoplado.

La paradoja de la arginina

Los primeros estudios que usaron sistemas libres de células sugirieron que el óxido nítrico (NO) se produce a partir de la arginina. A principios de la década de 1990, los científicos creían que la producción de óxido nítrico dependía de la arginina libre procesada por la enzima NO sintasa. En este momento, se creía que la citrulina era un subproducto del proceso en lugar de un impulsor. De hecho, en este momento, la citrulina se usaba como un indicador de la producción de NO, ya que se creía erróneamente que era un subproducto de la producción de NO. Ver *p. ej.*, Moncada & Higgs *N. Engl. J. Med.* 329 (27) 2002–2012 (1993) y Stamler, *et al.* *Science* 258 (5090) 1898–1902 (1992). Esta creencia anterior, sin embargo, era contraria a los estudios realizados en condiciones fisiológicas y publicados posteriormente, estos estudios posteriores describen la «Paradoja de la arginina». La «paradoja de la arginina» se manifiesta por un aumento en la producción de NO ante niveles de arginina en plasma inalterados.

Los estudios muestran que la concentración de arginina en mitad de la saturación para eNOS es inferior a 10 μM . También se informó en revistas que las concentraciones de arginina intracelular varían de 0.1 a 0.8 mM en cultivos celulares endoteliales. Por consiguiente, se esperaba que el sitio activo de eNOS estuviera saturado por la arginina intracelular en estas células, y no se esperaba que aumentar la arginina extracelular aumentara la producción de NO. Esta observación fue informada por Fike *et al.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274: L517–L526 (1998).

Sin embargo, estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que se puede aumentar la producción de NO por células endoteliales en condiciones fisiológicas mediante arginina extracelular, a pesar de la saturación de la concentración de arginina intracelular. Por otra parte, la concentración intracelular de arginina en células endoteliales puede variarse más de 100 veces sin cambiar la producción de óxido nítrico (NO). Esta observación, es decir, que la administración de arginina extracelular impulsa la producción de NO aun cuando la arginina intracelular está disponible en exceso, se llama la «Paradoja de la arginina». McDonald, *et al.* (1997) *The Journal of Biological Chemistry* 272(50): 31213–31216, 31213. Adicionalmente, durante este tiempo se halló que la arginina exógena no aumenta la producción de NO en sistemas fisiológicos. Ver, *p. ej.*, Blum, *et al.* *Circulation* 101(18): 2160–2164 (2000) y Chin-Dusting, *et al.* *J. Am. Coll. Cardiol.* 27(5): 1207–1213 (1996).

Ahora se comprende que la citrulina puede estimular la producción de óxido nítrico (NO) incluso en presencia de niveles saturados de arginina. Adicionalmente, la citrulina extracelular no influye en los niveles de arginina intracelular. Por lo tanto, la producción de NO depende en realidad del uso de citrulina reciclada o producida en el ciclo de la urea que entra al complejo enzimático con argininosuccinato y arginina como productos intermedios internos, y no de un suministro de arginina exógeno. Dioguardi (2011) *J Nutrigenet Nutrigenomics* 4: 90–98. Por consiguiente, niveles de citrulina en plasma adecuados reducirán la gravedad e incidencia de secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar.

Secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar

Una cantidad de factores ponen al pulmón en riesgo de lesión durante el BCP. El principal entre estos es la activación superficial de neutrófilos y otros leucocitos, complemento y citocinas (proinflamatorias y antiinflamatorias), entre otros, y una cascada inflamatoria sistémica asociada. Apostolakis *et al.* (2010) *Journal of Cardiac Surgery* 25(1): 47–55; Schure (2010) *Southern African Journal of Anesthesia and Analgesia* 16(1): 46–51. El grado de daño del pulmón por la respuesta inflamatoria mediada por la activación por contacto de leucocitos durante la circulación extracorpórea puede variar en gravedad, de cambios microscópicos sin consecuencia clínica alguna a un síndrome de filtración capilar o, en el peor de los casos, insuficiencia respiratoria aguda.

La lesión pulmonar se manifiesta de varias maneras y puede implicar tanto tejidos de pulmón vasculares como parenquimales. Los efectos parenquimales del BCP se reflejan en alteraciones en la distensibilidad pulmonar, más comúnmente, con relación a un aumento de agua en los pulmones. El impacto de esto en el paciente es un requisito

para el aumento de ventilación asistida y una reducción de la capacidad de los pulmones para cumplir con su función en el intercambio de gas. Los efectos vasculares se manifiestan en cambios en la resistencia vascular pulmonar, lo que a su vez afecta la función del ventrículo derecho. Esta afección constituye, de hecho, la hipertensión arterial pulmonar. Los pulmones se encuentran en una posición particular en la circulación y, por lo tanto, pueden ser vulnerables a distintos mecanismos de lesión. Los leucocitos en circulación que producen mediadores inflamatorios luego del contacto con superficies en el aparato de BCP o mediante el daño directo causado por el equipo de BCP son responsables de solo parte del daño inflamatorio que puede ocurrir en el pulmón. Clark (2006) *Perfusion* 21(4): 225–228. El pulmón también es una fuente importante de células inflamatorias así como un objetivo para el daño causado por esas mismas células. Las consecuencias de los efectos mecánicos e inflamatorios en el pulmón son la reducción de la capacidad residual funcional, reducción de la distensibilidad y deterioro del intercambio de gas. Estos cambios se asocian en última instancia con una mayor resistencia vascular pulmonar y presión arterial pulmonar.

La lesión pulmonar aguda inducida por BCP conduce a problemas cardiopulmonares significativos. La respuesta inflamatoria conduce a la constricción de la vasculatura pulmonar y sistémica. La constricción conduce a una mayor carga de trabajo del ventrículo derecho y el ventrículo izquierdo. La respuesta inflamatoria también conduce a un edema pulmonar y al deterioro de la distensibilidad pulmonar y la función pulmonar postoperatoria. Los tratamientos estándares para estas complicaciones postoperatorias incluyen ventilación mecánica hasta que la función pulmonar vuelva a la normalidad y soporte inotrópico hasta que el tono vascular sistémico y pulmonar vuelva a la normalidad, reduciendo finalmente la carga de trabajo del ventrículo derecho y el ventrículo izquierdo. La ventilación mecánica y el soporte inotrópico son terapias que, por lo tanto, pueden ser biomarcadores eficaces de lesión pulmonar aguda inducida por el BCP. Además, la ventilación mecánica prolongada, a su vez, puede conducir algunas veces a otras morbilidades que incluyen lesión pulmonar asociada al ventilador, neumonía asociada al ventilador (VAP, por sus siglas en inglés), infecciones de torrente sanguíneo asociadas a la línea central (CLABSI, por sus siglas en inglés) y estadías en la unidad de cuidados intensivos incluso más extensas. La prevención de secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar es, por lo tanto, un objetivo terapéutico deseable.

Pacientes pediátricos con CHD

Los niños que se someten a cirugía por defectos cardíacos congénitos son especialmente susceptibles a desarrollar una lesión pulmonar aguda inducida por BCP debido a diferencias dependientes de la edad en la respuesta inflamatoria y la sensibilidad elevada de sus sistemas orgánicos inmaduros a lesiones, así como también diferencias distintivas entre BCP pediátrico y adulto. Kozik & Tweddell (2006) *The Annals of Thoracic Surgery* 81(6): S2347–S2354. En particular afecta a neonatos y lactantes debido a que el tamaño de circuito extracorpóreo relativamente grande, la preparación sanguínea y la necesidad de aumento de velocidades de flujo resultan en una exposición mayor de la sangre a la superficie extraña. Schure (2010) *Southern African Journal of Anesthesia and Analgesia* 16(1): 46–51.

Para la cirugía cardíaca congénita, el circuito extracorpóreo se puede ajustar a un amplio intervalo de grupos etarios y variaciones de tamaños, de lactantes prematuros de 1.5 kg a adolescentes o adultos de >100 kg. Los lactantes y niños tienen volúmenes de sangre en circulación más pequeños, tasas de consumo de oxígeno más elevadas y, usualmente, lechos vasculares pulmonares muy reactivos. Además, los neonatos y lactantes tienen termorregulación lábil y sistemas orgánicos inmaduros con múltiples implicaciones para la tolerancia isquémica y la respuesta inflamatoria. Muchas reparaciones complejas requieren un campo de operación sin sangre, el que puede ser difícil de conseguir en presencia de derivaciones intracardiacas o extra cardiacas, colaterales aortopulmonares o el aumento de otro modo del regreso venoso pulmonar. Schure (2010) *Southern African Journal of Anesthesia and Analgesia* 16(1): 46–51.

Las diferencias entre BCP de adulto y pediátrico se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Visión general en forma tabular de las diferencias entre BCP pediátrico y de adulto (Schure 2010)

Parámetro	Paciente adulto	Paciente pediátrico
Volumen de sangre estimado	65 ml/kg (4-5 litros por 70 kg)	< 10 kg: 85 ml/kg (285 ml por 3 kg)
Efectos de dilución en volumen de sangre	25 - 33 %	100 - 200 %
Adición de sangre entera o glóbulos rojos empaquetados para preparación	Rara vez	A menudo
Consumo de oxígeno	2 - 3 ml/kg/min	6 - 8 ml/kg/min
Flujo de BCP completo	50 - 75 ml/kg/min	150 - 200 ml/kg/min por < 3 kg
Temperatura de BCP mínima	Rara vez < 25 - 32°C	Comúnmente 15 - 20°C
Uso de paro circulatorio total o perfusión de bajo flujo regional	Raro	Común
Presiones de perfusión	50 - 80 mmHg	20 - 50 mmHg
Manejo de ácido-base	Principalmente Alfa-stat	Alfa-stat y/o pH-stat
PaCO2 medida	30 - 45 mmHg	20 - 80 mmHg
Regulación de glucosa hipoglucemia hiperglucemia	Raro (lesión hepática importante); Común, tratada con Insulina	Común, reservas reducidas Menos común, riesgo de hipoglucemia de rebote

El estado funcional y estructural del lecho vascular pulmonar cumple una función fundamental en la presentación y el rendimiento de los niños con enfermedad cardiovascular congénita. Sin embargo, es en el período postoperatorio inmediato que estos pacientes pediátricos son más vulnerables a secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar. Las secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar representan una interacción compleja entre la condición preoperatoria del paciente (cabe destacar la edad al momento de la reparación, tipo de lesión y presencia de un síndrome) y la alteración inevitable en el medio de péptido endócrino y vasoactivo que resulta de la cirugía cardíaca. Los factores importantes que conducen a una mayor vasoconstricción son el baipás cardiopulmonar, hipotermia y paro circulatorio con algún grado de isquemia asociado. Las lesiones cardíacas residuales y las secuelas de la respuesta de estrés, hipoxia, acidosis respiratoria y metabólica todas pueden contribuir a desequilibrios adicionales que favorecen la vasoconstricción pulmonar. Muchas de las manifestaciones de lesión pulmonar aguda asociadas al BCP se pueden explicar total o parcialmente mediante la disfunción endotelial, lo que provee de una vez una posible hipótesis unificadora, así como también un posible objetivo terapéutico. La lesión pulmonar aguda asociada al BCP también puede conducir a secuelas cardíacas adversas importantes. La respuesta inflamatoria luego de la cirugía por CHD se asocia comúnmente a la interacción ventricular-vascular anómala, con vasoconstricción sistémica y poscarga elevada, así como también con lesión de miocardio con deterioro de función sistólica y diastólica. En una proporción de pacientes, estas manifestaciones hemodinámicas pueden conducir a la grave consecuencia de bajo rendimiento cardíaco. Shekerdemian (2009) Heart 95(15): 1286-1296.

Las graves secuelas de lesión pulmonar son clínicamente importantes para el resultado. Estas secuelas son factores de riesgo para estadías extensas en unidades de cuidados intensivos y de riesgo de vida. La labilidad del tono vascular pulmonar es común en neonatos y lactantes luego de la cirugía por CHD. Esto puede resultar extremadamente problemático luego de las reparaciones biventriculares en pacientes que presentaron flujo pulmonar no restringido preoperatorio (defectos del tabique grandes, tronco arterial común) o hipertensión venosa pulmonar (drenaje venoso pulmonar anómalo obstruido). La inestabilidad de la resistencia vascular pulmonar también es común luego de la cirugía paliativa en pacientes con una circulación funcionalmente univentricular, lo que incluye operaciones de tipo Norwood, una derivación de arteria sistémica a pulmonar o una banda arterial pulmonar. Mientras que muchas intervenciones terapéuticas optimizan la administración de oxígeno sistémica a través de sus influencias directas en el miocardio y vasculatura sistémica, la manipulación del tono vascular pulmonar puede cumplir una función importante en la optimización de la circulación de niños que se someten a cirugía por enfermedad cardíaca. Shekerdemian (2009) Heart 95(15): 1286-1296.

Se pretende que la citrulina, con su mecanismo de acción, sea un tratamiento preventivo para reducir el riesgo de desarrollo de las secuelas de la lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar y, por lo tanto, influir de forma positiva en la recuperación postoperatoria de pacientes pediátricos que se someten a cirugía por defectos cardíacos congénitos.

Los defectos cardíacos, incluidos los defectos cardíacos congénitos, incluyen, de modo no taxativo, defectos cardíacos asociados con exceso de flujo sanguíneo pulmonar. El defecto cardíaco puede ser una comunicación interauricular, por ejemplo, una comunicación interauricular grande. El defecto cardíaco puede ser una comunicación interventricular, por ejemplo, una comunicación interventricular (VSD) no restrictiva grande. El defecto cardíaco puede ser una lesión de ventrículo único. La lesión de ventrículo único puede repararse mediante los procedimientos de Glenn y Fontan. El defecto cardíaco puede ser una estenosis de la válvula aórtica (AVS), comunicación interauricular (ASD), coartación de la aorta (CoA), defecto del canal auriculoventricular completo (CAVC), d-transposición de las grandes arterias, anomalía de Ebstein, l-transposición de las grandes arterias, conducto arterioso persistente (PDA), estenosis de la válvula pulmonar, defectos del ventrículo único, tetralogía de Fallot, conexión venosa pulmonar anómala total (TAPVC), tronco arterioso o comunicación interventricular (VSD). El paciente puede ser un neonato, un niño, un adolescente o un adulto.

La citrulina y la arginina son diferentes en mecanismo y efecto

La arginina y citrulina son ambos productos del ciclo de la urea, pero en etapas diferentes del ciclo. En células que eliminan nitrógeno, la arginina se procesa por arginasa en urea, mientras que en las células que producen óxido nítrico, la arginina es procesada por la óxido nítrico sintasa (NOS) para producir óxido nítrico y citrulina. La arginina extracelular no es eficaz en la generación de un aumento significativo en la producción estimulada o no estimulada de óxido nítrico en células vasculares endoteliales. *Ver también* Surdacki, *et al.* Wien Klin Wochenschr. (1994) 106(16): 521-6. Por el contrario, la citrulina es un potente estimulador de la producción de NO.

La Figura 23 muestra un experimento que mide la producción de óxido nítrico por células vasculares endoteliales humanas expuestas a ningún agente (control negativo), arginina, citrulina e histamina (control positivo). Estos agentes se administraron a células vasculares endoteliales humanas cultivadas estimuladas con acetilcolina. La medición de óxido nítrico fue a través de un sistema de Seiver de nitrato/nitritos. El experimento demuestra claramente que la arginina no tiene efecto sobre la producción de óxido nítrico por las células vasculares endoteliales humanas. La arginina aplicada directamente a una célula endotelial genera poca señal de producción de NO aumentada, incluso con concentraciones muy elevadas (10 mM). Por otra parte, la adición extracelular de citrulina a células endoteliales aumenta la producción de NO por estas células. Además, los inventores hallaron que bloquear el transporte de citrulina (a través del transportador SNAT1) reduce significativamente la producción de óxido nítrico en condiciones normales e hipóxicas.

Esta observación se debe en parte a la formación de complejos de las enzimas implicadas, que crean un túnel de sustrato en el que solo puede ingresar la citrulina. Más allá de la canalización del sustrato, también hay escaso transporte de arginina a las células. Este es el principal subyacente en la Paradoja de la Arginina en la que la arginina falla como efectora directa de la producción de óxido nítrico en un sistema de célula entera. *Ver, p. ej.,* Summar *et al.*, Mol. Genet. Metab. 2004; 81 Suppl 1:S12-9.

En condiciones fisiológicas, la citrulina puede estimular la producción de óxido nítrico (NO) incluso en presencia de niveles saturados de arginina. Adicionalmente, la citrulina extracelular no influye en los niveles de arginina intracelular. Por lo tanto, la producción de NO depende en realidad del uso de citrulina reciclada o producida en el ciclo de la urea que entra al complejo enzimático con argininosuccinato y arginina como productos intermedios internos, y no de un suministro de arginina exógeno. Dioguardi (2011) J Nutrigenet Nutrigenomics 4: 90-98.

Las moléculas de arginina y citrulina difieren, por ejemplo, en la producción de óxido nítrico. No hay pruebas o razón para creer que la citrulina puede sustituir todos los roles de la arginina en el cuerpo, incluidos roles tales como la producción de proteínas *de novo*. La arginina y citrulina no son equivalentes biológicos.

La arginina es el sustrato de la óxido nítrico sintasa (NOS) para generar óxido nítrico (NO) con citrulina como un subproducto. La citrulina se recicla nuevamente en arginina mediante argininosuccínico sintetasa (ASS) y argininosuccínico liasa (ASL), lo que constituye el ciclo citrulina-NO. La arginina se produce *in situ* por las enzimas de este ciclo, y las fuentes extracelulares y exógenas de arginina no reponen una deficiencia de arginina. *Ver, p. ej.,* Erez, *et al.* (2011) Nature Medicine 17(12): 1619-1626. Además, eNOS forma un dímero enzimático que necesita suficiente arginina para permanecer en la forma de dímero (activa). Como observó Erez, la citrulina es necesaria para la producción *in situ* de arginina, y las fuentes exógenas de arginina no son suficientes para proporcionar la arginina requerida por NOS para la producción de NO. Cuando los niveles de arginina caen, como durante la hipoxia, el dímero se desacopla y comienza a producir radicales libres de oxígeno y peroxinitritos. Se ha demostrado que los elevados niveles de citrulina en circulación proporcionan alguna protección contra el daño oxidativo en tejidos. *Ver, p. ej.,* Grisafi *et al.* Lung (2012) 190(4): 419-30.

Los inventores hallaron que la arginina exógena en sistemas fisiológicos no aumenta la producción de NO. *Ver, p. ej.,*

Chin-Dusting, *et al.* *J. Am. Coll. Cardiol.* 27(5): 1207-1213 (1996). Cuando los niveles de arginina caen, como durante la cirugía cardiopulmonar y el período postoperatorio posterior, el dímero NOS, es decir, la enzima, se desacopla y comienza a producir radicales libres del oxígeno (O^*). De manera adicional, la producción de superóxido puede aumentar a partir de fuentes enzimáticas distintas de eNOS, tales como NADPH oxidasa. Liu, *et al.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2006) 290: L2–L10. Esta producción de superóxido en exceso puede haber interactuado directamente con el NO para reducir su producción local. Aquí, mantener los niveles adecuados de citrulina en plasma permite la producción suficiente de NO para mantener la enzima eNOS como un dímero e impedir la producción de radicales del oxígeno.

Hemofiltración y diálisis pueden eliminar citrulina de forma involuntaria

En un gran estudio prospectivo de observación de niños que se someten a cirugía cardíaca congénita, los niveles de arginina y citrulina en plasma se redujeron de forma significativa después de la cirugía y no regresaron a los niveles de referencia preoperatorios por hasta 48 horas.

El aumento de tono vascular pulmonar (PVT, por sus siglas en inglés) puede ser un problema perioperatorio en niños que se someten a cirugía cardíaca congénita, incluso para pacientes que no se consideraban en riesgo significativo de hipertensión arterial pulmonar grave antes de la cirugía. Se llevaron a cabo estudios de seguridad clínica y farmacocinéticos que muestran que tanto la citrulina oral como intravenosa se toleran bien y sin efectos secundarios adversos en lactantes y niños que se someten a la reparación de defectos cardíacos congénitos. Un ensayo posterior pequeño, aleatorizado y controlado por placebo de citrulina mostró que la citrulina se toleró bien, sin eventos adversos; sin embargo, en algunos pacientes, se produjo eliminación significativa de citrulina durante la hemofiltración y diálisis llevadas a cabo durante el baipás cardiopulmonar. En estudios previos de posibles factores de riesgo genéticos para mayor PVT, se observó que el genotipo de un polimorfismo importante en la enzima clave del ciclo de la urea, carbamoyl fosfato sintetasa 1 (T1405N de CPSI), afecta el riesgo de tono vascular pulmonar elevado en lactantes y niños que se someten a reparación quirúrgica de defectos cardíacos congénitos y en neonatos en riesgo de hipertensión pulmonar postoperatoria (PPHN). Además, se observó que todos los pacientes, independientemente de genotipo de polimorfismo, presentaron una reducción significativa en los niveles en plasma de intermedios claves del ciclo de la urea, los que incluyen citrulina y arginina. Estas asociaciones impulsaron a los inventores a investigar complementos perioperatorios con citrulina.

Los ensayos de complementación iniciales usaron citrulina oral a una dosis de 1.9 g/kg antes del baipás cardiopulmonar, inmediatamente después de la cirugía y cada 12 horas, continuando durante 48 horas después de la cirugía. La citrulina por vía oral se toleró bien sin pruebas de eventos adversos significativos (tal como hipotensión sistémica). Además, se observó que los pacientes que presentaron un nivel de citrulina en plasma de 12 horas >37 $\mu\text{mol/l}$ (el intervalo superior de niveles normales) no desarrollaron aumento de PVT.

Desafortunadamente, no todos los pacientes que recibieron citrulina por vía oral alcanzaron estos niveles. Estas observaciones ayudaron a diseñar estudios posteriores con citrulina intravenosa. En un estudio con aumento de dosis dirigido a un nivel en plasma sostenido de alrededor de 100 $\mu\text{mol/l}$, los inventores observaron que la citrulina intravenosa tiene una semivida bastante corta. Para resolver este problema, los inventores desarrollaron un protocolo de administración de fármacos de combinación de bolo e infusión continua. El protocolo combinado de un bolo de 150 mg/kg al inicio de la cirugía, seguido 4 horas después de la cirugía con una infusión continua de 9 mg/kg/hora, resultó en niveles sostenidos de citrulina en plasma de aproximadamente 100 $\mu\text{mol/l}$. No se observaron efectos secundarios adversos.

En Vanderbilt, se han tratado 77 pacientes conforme a este protocolo. Se interrumpió el estudio para preparar un ensayo controlado por placebo aleatorizado multicéntrico más grande. El análisis de los datos de estos 77 pacientes mostró que una mayoría que recibió citrulina no llegó al nivel de citrulina en plasma objetivo sostenido terapéutico de alrededor de 100 $\mu\text{mol/l}$ principalmente debido a una remoción de citrulina previamente desconocida mediante filtración y hemoconcentración producida durante el baipás cardiopulmonar.

Citrulina y baipás cardiopulmonar

La complementación de citrulina perioperatoria intravenosa aumenta los niveles postoperatorios de arginina en plasma y evita el desacoplamiento de eNOS, lo que conduce a una disminución en las secuelas de lesión inducida por baipás cardiopulmonar. Los inventores desarrollaron un protocolo mejorado para mantener el tono vascular pulmonar durante y después de la cirugía, que comprende la administración de un bolo intravenoso de citrulina de 150 mg/kg al comienzo del baipás cardiopulmonar (BCP), la adición de L citrulina a una concentración de 200 $\mu\text{mol/l}$ al fluido de reemplazo de filtración o hemoconcentración usado durante el baipás cardiopulmonar, un bolo de citrulina de 20 mg/kg, 30 minutos después de la decanulación del BCP, inmediatamente seguido por el inicio de una infusión continua de 9 mg/kg/h durante 48 horas. El óxido nítrico (NO) inhalado, al igual que la mayoría de las demás terapias, es una terapia reactiva que primero requiere que un paciente desarrolle las complicaciones respiratorias de baipás cardiopulmonar antes de que pueda iniciarse la terapia. Esto contrasta notablemente con la citrulina, que parece impedir el comienzo de las secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar.

Este protocolo corregido fue diseñado para mantener un nivel de citrulina en plasma terapéutico sostenido por encima del umbral objetivo de alrededor de 100–200 $\mu\text{mol/l}$ desde el inicio del baipás cardiopulmonar, durante la cirugía y por hasta alrededor de 48 horas después de la cirugía.

5 No se requiere acceso IV independiente para la citrulina. La formulación de citrulina es isotónica y puede correr a través de una vía IV periférica o un catéter venoso central. La citrulina es un aminoácido y, por lo tanto, a efectos de la compatibilidad, se puede tratar como nutrición parenteral. De manera adicional, la citrulina es compatible con fluidos usados para la filtración o hemoconcentración durante el baipás cardiopulmonar.

10 Con referencia a la Figura 3, un ejemplo de diagrama de flujo muestra un método para mantener niveles de citrulina en plasma adecuados que comprende la administración de citrulina a un paciente durante y después de la cirugía.

Con referencia a la Figura 3, durante la etapa preoperatoria, se puede administrar un bolo de citrulina de 150 mg/kg al paciente 100. Durante la cirugía, es posible administrar citrulina a una concentración de 200 $\mu\text{mol/l}$ al fluido de reemplazo de filtración o hemoconcentración usado durante la cirugía 200. Durante la etapa postoperatoria, se puede administrar un bolo de citrulina de 20 mg/kg 300 y a continuación una infusión continua de 9 mg/kg/hora durante 48 horas 400.

Formulaciones de citrulina

20 La citrulina (ácido 2-amino-5-(carbamoilamino)pentanoico) [$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$] es un aminoácido. Se puede elaborar la solución de citrulina para la administración IV mediante métodos conocidos en la técnica. Ver, p. ej., Kakimoto, *et al.* (1971) *Appl Microbiol* 22(6): 992–999.

Métodos de uso

La citrulina puede administrarse antes de un procedimiento quirúrgico. La dosificación adecuada puede incluir un bolo de citrulina intravenoso de 150 mg/kg al comienzo del baipás cardiopulmonar. La citrulina se puede administrar durante un procedimiento quirúrgico. Una dosificación adecuada puede ser la adición de citrulina a una concentración de 200 $\mu\text{mol/l}$ al fluido de filtración y hemoconcentración usado durante el baipás cardiopulmonar. La citrulina se puede administrar después de un procedimiento quirúrgico. Un bolo de citrulina de 20 mg/kg 30 minutos después de la decanulación del baipás cardiopulmonar, inmediatamente seguido de una infusión continua de 9 mg/kg/h durante 48 horas. El método descrito en la presente puede usarse para mantener el nivel de citrulina en plasma de un paciente por encima de alrededor de 37 $\mu\text{mol/l}$. El fluido de reemplazo de filtración o hemoconcentración se puede proporcionar como un fluido estándar p. ej., Plasmalyte® (solución isotónica no pirógena estéril) con citrulina agregada para lograr una concentración de citrulina de 200 $\mu\text{mol/l}$. Las dosis se pueden administrar mediante un catéter intravenoso central que se colocará luego de la inducción de anestesia o a través del circuito de baipás.

Un paciente puede recibir una infusión de citrulina por una vía intravenosa para mantener un nivel de citrulina en plasma. Un protocolo para mantener un suministro de citrulina en plasma adecuado durante la cirugía puede comprender la administración de un bolo intravenoso de citrulina (p. ej., 150 mg/kg) al comienzo del baipás cardiopulmonar (BCP), la adición de citrulina (p. ej., a una concentración de 200 $\mu\text{mol/l}$) al fluido de reemplazo de hemoconcentración o filtración usado durante la cirugía, opcionalmente, baipás cardiopulmonar, un bolo de citrulina (p. ej., 20 mg/kg) 30 minutos después de la decanulación del BCP, inmediatamente seguido por el inicio de una infusión continua (p. ej., 9 mg/kg/h) durante 48 horas.

El bolo de citrulina intravenoso al comienzo del baipás cardiopulmonar (BCP) puede ser de alrededor de 100–300 mg/kg. El bolo intravenoso de citrulina al comienzo del baipás cardiopulmonar (BCP) puede ser de alrededor de 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 mg/kg. En un modo preferido, el bolo intravenoso de citrulina al comienzo del baipás cardiopulmonar (BCP) puede ser de alrededor de 150 mg/kg.

Se puede agregar citrulina a una concentración de alrededor de 100–300 $\mu\text{mol/l}$ al fluido de reemplazo de hemoconcentración o filtración usado durante la cirugía, incluido, opcionalmente, baipás cardiopulmonar. Se puede agregar citrulina a una concentración de alrededor de 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 $\mu\text{mol/l}$ al fluido de reemplazo de hemoconcentración o filtración usado durante la cirugía, opcionalmente, durante el baipás cardiopulmonar. En un modo preferido, se puede agregar la citrulina a una concentración de alrededor de 200 $\mu\text{mol/l}$ al fluido de reemplazo de hemoconcentración o filtración usado durante la cirugía, opcionalmente, durante el baipás cardiopulmonar. Por ejemplo, cualquier fluido agregado o extraído durante la cirugía debe tenerse en cuenta de manera de mantener una concentración de alrededor de 200 $\mu\text{mol/l}$ de citrulina durante todo el transcurso de la cirugía.

El bolo de citrulina administrado 30 minutos después de la decanulación, usualmente, después del baipás cardiopulmonar, puede ser de alrededor de 10–30 mg/kg. Se puede administrar un bolo de citrulina de alrededor de 10, 15, 20, 25 o 30 mg/kg poco después del fin del baipás cardiopulmonar, usualmente 30 minutos después de la decanulación. En un modo preferido, se puede administrar un bolo de citrulina de alrededor de 20 mg/kg, usualmente 30 minutos después de la decanulación, después del baipás cardiopulmonar.

La infusión continua puede ser de alrededor de 5–15 mg/kg/h de citrulina, alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 mg/kg/h de citrulina. La infusión continua puede ser de alrededor de 9 mg/kg/hora de citrulina.

Se puede administrar la citrulina oralmente a una dosificación de alrededor de 5–15 g/kg, es decir, alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 g/kg de citrulina. La dosificación oral de citrulina puede ser de alrededor de 9 g/kg de citrulina.

El nivel objetivo de citrulina en plasma puede mantenerse a alrededor de 37 µmol/l a 2.5 mM. Por ejemplo, el nivel de citrulina en plasma del paciente puede mantenerse por encima de alrededor de 37, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 o 300 µmol/l. El nivel de citrulina en plasma del paciente puede mantenerse por encima de alrededor de 37, 100 o 200 µmol/l. Los métodos descritos en la presente pueden usarse para mantener el nivel de citrulina en plasma de un paciente entre alrededor de 37 µmol/l a 200 µmol/l, 100 µmol/l a 1 mM/l, 150 µmol/l a 500 µmol/l de citrulina.

La citrulina se puede proporcionar en forma de unidad de dosis. Por ejemplo, se puede proveer la citrulina en un recipiente que contiene 300 mg de citrulina estéril formulada para inyección. Esta se puede reconstituir para su uso con 6 ml de agua estéril y se puede diluir adicionalmente con aproximadamente 5.9 ml de solución de NaCl estéril al 0.9% Ph. Eur. hasta un volumen total de 12 ml y una concentración de 300 mg/12 ml (es decir, 25 mg/ml). La citrulina se puede formular para inyección a una concentración de 10–40 mg/ml, por ejemplo, 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35 o 40 mg/ml. La citrulina se puede proporcionar como un producto farmacológico como 500 mg de citrulina estéril para inyección en 10 ml de agua estéril. Esta se puede usar para la infusión de pacientes con cloruro de sodio al 0.9% Ph. Eur.

En una modalidad, se administra al paciente un bolo de 150 mg/kg de citrulina el día de la cirugía, agregando 200 µmol/l de citrulina a los fluidos de hemoconcentración y filtración. Alrededor de 30 minutos después de la cirugía, se administra un bolo de 20 mg/kg de citrulina y se inicia una infusión intravenosa continua de citrulina de 9 mg/kg/hora después del bolo (*p. ej.*, dentro de los 5–10 minutos, preferentemente inmediatamente después de la administración del bolo) y se mantiene durante 6–48 horas, preferentemente durante 48 horas.

Por ejemplo, se puede administrar un bolo de L-citrulina de 150 mg/kg al inicio del baipás cardiopulmonar (BCP) con citrulina a una concentración de 200 µmol/l agregada al fluido de filtración y hemoconcentración usado durante el BCP; se puede administrar un bolo de 20 mg/kg de L-citrulina 30 minutos después de la decanulación del BCP, inmediatamente seguido de una infusión continua de 9 mg/kg/h de L-citrulina durante 48 horas. Las dosis se pueden administrar mediante un catéter IV central que se puede colocar después de la inducción de la anestesia o a través del circuito de baipás. No se requiere un acceso IV separado para la administración de este fármaco. La citrulina es isotónica y puede correr a través de una vía IV periférica o un catéter venoso central. La citrulina (L-citrulina) es un aminoácido y, por lo tanto, a efectos de la compatibilidad, el producto farmacológico se trata como nutrición parenteral. De manera adicional, es compatible con fluidos usados para la filtración o hemoconcentración durante el BCP.

Parámetros postoperatorios

Se puede evaluar el resultado clínico de los pacientes tratados con citrulina intravenosa conforme a la necesidad y la duración de ventilación mecánica postoperatoria, la incidencia de aumento de PVT postoperatorio mediante ecocardiogramas, los niveles enzimáticos hepáticos y de creatinina en suero, el índice inotrópico, la extensión y el volumen del drenaje de tubo torácico, la extensión de la estadía en UCI, la duración en hospitalización y/o la tasa de supervivencia.

Ventilación mecánica postoperatoria: La duración de la ventilación mecánica invasiva postoperatoria es el tiempo en horas de separación entre el baipás cardiopulmonar y la extubación endotraqueal. Una reducción del tiempo con ventilación mecánica invasiva postoperatoria es un resultado postoperatorio positivo.

Incidencia de aumento de PVT postoperatorio mediante ecocardiogramas: El aumento de PVT se define como una presión ventricular derecha (RV) > ½ presión arterial sistémica. Si el PVT postoperatorio no cambia en comparación con un grupo de control, este es un resultado postoperatorio positivo.

Enzimas hepáticas y creatinina en suero: Se pueden registrar a diario los niveles de CBC, creatinina y electrolitos en suero desde el ingreso a la PCCU hasta el alta de la PCCU. De manera adicional, se pueden obtener enzimas hepáticas durante los periodos punto de referencia, 24 horas y 28 días/alta. Si los niveles de CBC, creatinina y electrolitos en suero son comparables a un grupo de control, esto representará un resultado postoperatorio positivo.

Índice inotrópico: Se debe monitorear la dosis de inotrópicos después de la cirugía a partir del momento de ingreso a la PCCU con el siguiente sistema de calificación:

Dopamina (mcg/kg/min) x 1

más Dobutamina (mcg/kg/min) x 1

más Milrinona (mcg/kg/min) x 10

más Epinefrina (adrenalina) (mcg/kg/min) x 100

más Fenilefrina (mcg/kg/min) x 100

más Norepinefrina (noradrenalina) (mcg/kg/min) x 100
= índice inotrópico total

Ver, p. ej., Hoffman, *et al.* Circulation (2003) 107: 996-1002. Una reducción del índice inotrópico sería un resultado postoperatorio positivo.

Duración de uso de tubo torácico: se puede registrar la extensión postoperatoria total en horas y el volumen total del drenaje del tubo cardíaco en cc antes de que el equipo quirúrgico suspenda los tubos torácicos. Una reducción de la extensión de tiempo postoperatorio y/o el volumen total del drenaje del tubo torácico, en comparación con un grupo de control, representaría un resultado postoperatorio positivo.

Duración de estadía en unidad de cuidados intensivos (UCI): se puede calcular la duración de la estadía en la UCI de dos formas: (1) como cantidad total de días postoperatorios en la UCI o unidad de cuidados intermedios hasta que el equipo médico indica que el paciente está listo para ser transferido a un área de cuidados no intensivos y (2) como cantidad total de horas postoperatorias que el paciente requiere ventilación mecánica o asistencia continua mediante vasodilatadores o agentes inotrópicos. Una reducción de la duración de la estadía en la UCI conforme a cualquiera de estas medidas representaría un resultado postoperatorio positivo.

Duración de la hospitalización: se puede calcular la duración de la hospitalización como la cantidad total de días después de la cirugía hasta el alta del hospital. Una reducción de la duración de la hospitalización sería un resultado postoperatorio positivo.

Supervivencia: se puede registrar tanto una supervivencia postoperatoria de 28 días como la supervivencia al alta del hospital. El aumento de la supervivencia después de 28 días desde la cirugía representaría un resultado postoperatorio positivo.

Mejora hemodinámica: los datos hemodinámicos incluido el ritmo cardíaco, presión sanguínea arterial sistémica, O₂Sat, CVP y PAP se pueden monitorear como un indicador de la gravedad o incidencia de la lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar como una consecuencia del desacoplamiento de eNOS debido a una caída en los niveles de citrulina en plasma.

De manera adicional, la mejora hemodinámica y el tono vascular pulmonar postoperatorio (PVT) se pueden usar como indicadores de una mejora en la afección del paciente, p. ej., disminución de la gravedad o incidencia de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar como una consecuencia del desacoplamiento de eNOS debido a una caída en los niveles de citrulina en plasma. Los productos finales de la peroxidación lipídica y grupos carbonilo de proteínas se pueden usar como medidas del daño oxidativo. Adicionalmente, el peróxido de hidrógeno en fluidos corporales, incluida la orina, también puede usarse para detectar daño oxidativo. Ver, p.ej., Halliwell & Whiteman British Journal of Pharmacology (2004) 142: 231-255.

Sorprendentemente, los inventores descubrieron que la administración de citrulina intravenosa mitiga las secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar, tal como lo demuestra la reducción de la necesidad postoperatoria de ventilación mecánica y terapia inotrópica en sujetos pediátricos sometidos a reparación de defectos cardíacos congénitos.

Por ejemplo, se redujo la duración de la ventilación mecánica, se redujo la duración de uso de inotrópicos para apoyar el gasto cardíaco, la duración del tratamiento con medicación vasoactiva simultánea fue más corta, y la necesidad general de asistencia respiratoria fue más baja en pacientes que recibieron citrulina en comparación con pacientes que recibieron placebo. Los pacientes que recibieron citrulina de acuerdo con los métodos descritos en la presente presentaron duraciones compuestas más cortas de ventilación de presión positiva y terapia con inotrópicos que los pacientes que recibieron un placebo. Los pacientes que recibieron citrulina de acuerdo con los métodos descritos en la presente estaban listos para el alta de una unidad de cuidados intensivos (UCI) antes que los pacientes que recibieron placebo. Adicionalmente, la duración de la estadía general en el hospital fue más corta para los pacientes tratados con citrulina en comparación con los pacientes tratados con placebo.

Aunque se ha descrito la invención en cierto detalle a modo ilustrativo y de ejemplo a efectos de claridad de comprensión, se debería entender que es posible poner en práctica determinados cambios y modificaciones comprendidos por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Se pretende que el alcance de las reivindicaciones adjuntas comprenda las modificaciones de los modos anteriormente descritos para llevar a cabo la invención que se comprenderán a la luz de la divulgación anterior o que resultarán evidentes con la práctica o la implementación

rutinarias de la invención a expertos en cirugía, bioquímica, medicina, fisiología y/o campos relacionados.

Todas las publicaciones (por ejemplo, bibliografía que no es de patentes), patentes, publicaciones de solicitud de patente y solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva indican el nivel de experiencia de los expertos en la técnica con la cual está relacionada esta invención. Todas dichas publicaciones (*p. ej.*, bibliografía que no es de patentes), patentes, publicaciones de solicitudes de patente y solicitudes de patentes se incorporan en la presente mediante referencia en la misma medida que si cada publicación, patente, publicación de solicitud de patente o solicitud de patente individual se indicara de forma específica e individual como incorporada mediante referencia.

Los ejemplos contenidos en la presente se ofrecen a modo de ilustración y no de modo taxativo.

Ejemplos

EJEMPLO 1

NIVELES DE ARGININA, CITRULINA Y NITRATO EN PLASMA Y RIESGO DE PPHN

Los neonatos que desarrollaron PPHN presentaron niveles inferiores de arginina, citrulina y nitrato en plasma en comparación con lactantes sin PPHN. Se midieron los metabolitos de NO (NOx) en plasma con la reacción de Griess modificada en diez neonatos. De ellos, 5 fueron PPHN+ y 5 fueron PPHN-. Los casos PPHN+ presentaron un nivel medio significativamente menor de NOx, ($p = 0.006$) (Figura 4). Los neonatos con PPHN presentaron niveles significativamente menores de arginina y citrulina en plasma en un análisis de aminoácidos (Figura 4). No existieron diferencias significativas en los niveles de cualesquiera otros aminoácidos individuales entre ambos grupos. La cantidad de sujetos fue demasiado pequeña como para evaluar las relaciones entre los niveles de aminoácido y NOx y el genotipo. Estos datos muestran que los lactantes con PPHN tienen productos e intermedios del ciclo de urea reducidos.

EJEMPLO 2

FUNCIÓN DEL CICLO DE LA UREA EN LACTANTES Y NIÑOS SOMETIDOS A BAIPÁS CARDIOPULMONAR PARA CORRECCIÓN DE DEFECTOS CARDÍACOS CONGÉNITOS

Se estudió la prevalencia del tono vascular pulmonar postoperatorio aumentado y el estado de la función del ciclo de la urea en lactantes y niños sometidos a cirugía cardíaca. Durante un período de 20 meses, se estudiaron de forma prospectiva 169 lactantes y niños que requirieron uno de los 6 procedimientos quirúrgicos específicos para corregir sus defectos cardíacos congénitos. Ver la Tabla 1. Luego de obtener el consentimiento de los padres, se extrajeron muestras de sangre de todos los pacientes para determinar el genotipo antes de la cirugía y se recolectó sangre para realizar análisis de aminoácidos en 5 puntos temporales diferentes (antes de la cirugía, inmediatamente después de la cirugía, 12 horas, 24 horas y 48 horas después de la cirugía). Todos los pacientes, excepto por aquellos sometidos a la etapa I del procedimiento de Norwood, se monitorearon para determinar el aumento de tono vascular pulmonar postoperatorio (PVT+) definido como una media de presión PA >20 mmHg. Se definieron los lactantes sometidos a la etapa I del procedimiento de Norwood como PVT+ si presentaron un requisito clínico de NO inhalado usado para saturaciones arteriales $<60\%$ con presiones sistémicas adecuadas.

La Tabla 2 muestra la edad promedio para cada uno de los seis procedimientos y la extensión de la exposición a baipás cardiopulmonar. De los 169 pacientes, 56 (33.1%) desarrollaron evidencia clínica de aumento de tono vascular pulmonar postoperatorio (PVT+). Muchos de estos pacientes requirieron intervención clínica que incluyó sedación, parálisis e hiperventilación. Se trataron 33 pacientes con NO inhalado (NO+).

Tabla 2: Tipo de procedimiento quirúrgico llevado a cabo en la población de estudio

Procedimiento	#	Edad (meses)	BCP(min)	PVT+	NO+
Derivación de Bidir Glenn	42	6.4 ± 2.5	84 ± 36	18 (42.9%)	10 (23.8%)
Etapas de Norwood I	33	0.8 ± 0.8	112 ± 32	14 (42.4%)	9 (27.3%)
Cierre de VSD	36	8.5 ± 11.9	91 ± 21	15 (41.7%)	1 (2.8%)
Reparación de AVSD	24	5.2 ± 2.5	111 ± 27	12 (50%)	3 (12.5%)
Cambio arterial	18	0.6 ± 1.3	157 ± 38	6 (33.3%)	2 (11.1%)
Fontan modificado	16	<u>24.8 ± 18.8</u>	<u>94 ± 25</u>	<u>4 (25%)</u>	<u>3 (18.8%)</u>
Cantidad total de pacientes	169	6.8 ± 10.6	104 ± 37	56 (33.1%)	33 (19.5%)

Los lactantes y niños sometidos a cirugía cardíaca mostraron un aumento de tono vascular pulmonar postoperatorio y estado de función del ciclo de urea.

5

Efecto del baipás cardiopulmonar en la función del ciclo de la urea

Se analizaron metabolitos de óxido nítrico en plasma e intermedios del ciclo de la urea perioperatorios para evaluar si un baipás cardiopulmonar reduciría la función del ciclo de la urea y disponibilidad de NO. Se tomaron muestras de plasma de cada uno de los 169 pacientes en 5 puntos temporales perioperatorios y se analizaron mediante cromatografía de intercambio catiónico con un analizador de aminoácidos Beckmann 7300 (Beckmann, Palo Alto, CA). Se usaron arginina y citrulina como los marcadores primarios del flujo del ciclo de la urea. Se usaron los niveles de metabolito de óxido nítrico en plasma como una medida indirecta de disponibilidad de NO mediante un ensayo colorimétrico con reactivos de Griess modificados y lecturas de absorbancia a 540 nm. Todos los pacientes requirieron baipás cardiopulmonar para corregir sus defectos cardíacos. En la población de estudio, el baipás cardiopulmonar provocó una reducción significativa de los niveles medios de arginina en todos los puntos temporales postoperatorios en comparación con los niveles preoperatorios (Figura 5). Se observó una reducción similar en los niveles medios de citrulina (Figuras 6A-6B). También se redujeron los niveles de metabolitos de NO en plasma inmediatamente después de la cirugía, pero mostraron un rebote parcial a las 12 y 24 horas, antes de volver a los niveles preoperatorios a las 48 horas (Figura 7). Por el contrario, el baipás no tuvo efecto en los aminoácidos totales no involucrados en el ciclo de la urea. Debido a que los aminoácidos no involucrados en el ciclo de la urea no se vieron afectados, estos datos sugieren que el efecto en la función del ciclo de la urea y la síntesis del sustrato de NO puede durar hasta alrededor de 48 horas después de la cirugía.

En pacientes que posteriormente desarrollaron un aumento de PVT postoperatorio (PVT+), se observó una reducción de los niveles de arginina en plasma en comparación con pacientes sin aumento de PVT (PVT-). Figura 8. No se realizaron observaciones similares respecto a metabolitos de NO y citrulina.

Conforme a una regresión lineal, la extensión del baipás cardiopulmonar no tuvo efecto alguno en los niveles de metabolitos de NO, citrulina y arginina en plasma en ninguno de los puntos temporales postoperatorios.

Resumen de resultados clínicos

Este estudio demuestra que el baipás cardiopulmonar usado para la corrección de defectos cardíacos congénitos provoca una reducción significativa de la función del ciclo de la urea con una reducción importante de la disponibilidad de precursores para la síntesis de óxido nítrico. El baipás cardiopulmonar usado para la corrección quirúrgica de defectos cardíacos congénitos provocó una reducción bastante significativa de la disponibilidad de precursores de óxido nítrico en el ciclo de la urea y los niveles de óxido nítrico medidos de forma indirecta mediante metabolitos de NO en plasma. Debido a que los aminoácidos no involucrados en el ciclo de la urea no se vieron afectados, un efecto en la función del ciclo de la urea y la síntesis del sustrato de NO puede durar hasta 48 horas después de la cirugía. Los pacientes con aumento de tono vascular pulmonar postoperatorio presentaron una reducción más significativa de los niveles de arginina que aquellos con tono normal.

Un estudio independiente demostró que el genotipo T1405N de CPSI influye en el riesgo de aumento de tono vascular pulmonar postoperatorio. Los niveles de arginina fueron significativamente diferentes entre genotipos T1405N de CPSI 48 horas después de la cirugía.

EJEMPLO 3

LA SUPLEMENTACIÓN DE CITRULINA INTRAVENOSA AUMENTA LOS NIVELES DE ARGININA EN PLASMA

El objetivo fue evaluar la seguridad de la citrulina intravenosa y su efecto sobre los niveles de arginina en suero en

cerdos jóvenes. Se utilizó un total de 9 cerdos Duroc de 5-21 días de edad con un peso mínimo objetivo de 4 kg. Se sometió a todos los cerdos jóvenes a inducción de anestesia y traqueotomía. Se colocaron líneas centrales en la arteria y la vena femoral, y se controló de forma continua la hemodinámica. Se administró citrulina (600 mg/kg IV) a 5 cerdos jóvenes. Se administró solución salina a los animales de control. Se extrajeron aminoácidos del suero antes y cada hora después de la administración de citrulina.

Se observaron picos de los niveles de arginina en suero 1-2 horas después de la administración de citrulina intravenosa y se mantuvieron por encima del punto de referencia tres horas después y fueron significativos en todos los puntos temporales en comparación con los controles ($p < 0.001$). No se observó inestabilidad hemodinámica. Ver Tablas 3–4.

Tabla 3: Niveles de arginina ($\mu\text{mol/l}$) después de citrulina intravenosa

Grupo de tratamiento (n=5)	Punto de referencia	1 hora después	2 horas después	3 horas después
L-Citrulina (600 mg/kg)	131.5	535.0	559.8	498.4
Control (solución salina)	89.6	103.0	118.1	136.7
Valor-p	0.1582	<0.001	<0.001	<0.001

Tabla 4: Presiones sanguíneas arteriales medias (mmHg) después de citrulina intravenosa

Grupo de tratamiento (n=4)	Predosis	1 hora después	2 horas después	3 horas después
L-Citrulina (600 mg/kg)	67.0	67.4	64.8	62.2
Control (solución salina)	53.2	58.7	55.7	54.7

$p > .05$ en todos los puntos temporales

Por consiguiente, la administración intravenosa de citrulina conduce a un aumento sostenido de los niveles de arginina y citrulina en plasma. Esto sería beneficioso para impedir el desarrollo de secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar.

EJEMPLO 4

SUPLEMENTACIÓN DE CITRULINA ORAL PERIOPERATORIA EN NIÑOS SOMETIDOS A CIRUGÍA CARDÍACA CONGÉNITA

El fin de este estudio fue evaluar la absorción y demostrar la seguridad de la citrulina oral como una posible alternativa a la citrulina IV. Se asignó de forma aleatoria la recepción de 5 dosis de citrulina oral (1.9 gramos/kg) contra placebo a 40 pacientes con uno de los 5 diagnósticos quirúrgicos anteriormente identificados. La primera dosis se administró inmediatamente antes de la cirugía y la segunda dosis, inmediatamente al llegar a la UCI pediátrica después de la cirugía, seguida por 3 dosis cada 12 horas. Los niveles de citrulina en plasma fueron significativamente mayores en el grupo de citrulina (36 contra 26 $\mu\text{mol/l}$, $p = 0.013$), lo que demuestra una absorción adecuada.

Tabla 5: Niveles en suero 12 horas después de la cirugía con y sin PHTN

Nivel de citrulina en suero 12 horas después de la cirugía	Sin PHTN	+ PHTN
<37 $\mu\text{mol/l}$	18 pacientes	9 pacientes
>37 $\mu\text{mol/l}$	12 pacientes	0 pacientes
valor $p = 0.036$ (prueba exacta de Fisher)		

El estudio no se potenció de forma adecuada para detectar un efecto sobre la incidencia de la hipertensión pulmonar postoperatoria (PHTN), sin embargo, los pacientes con nivel de citrulina en plasma >37 $\mu\text{mol/l}$ no desarrollaron hipertensión pulmonar. Esto sería beneficioso para impedir el desarrollo de secuelas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar.

EJEMPLO 5

ADMINISTRACIÓN DE CITRULINA DURANTE CIRUGÍA

El objetivo inicial fue evaluar la seguridad y la farmacocinética de tres dosis de citrulina intravenosa en niños sometidos a reparación quirúrgica de defectos cardíacos congénitos específicos. La administración de citrulina intravenosa tenía un riesgo teórico de hipotensión arterial sistémica. Se definió una reducción adversa de la presión arterial media como una reducción de más del veinte por ciento respecto a la referencia. Se calculó la presión sanguínea arterial media postoperatoria de referencia como el promedio de medidas de presión sanguínea arterial media tomadas cada 5 minutos durante los 30 minutos inmediatamente previos a la administración de la dosis o infusión postoperatoria. Después, se configuró el monitor que se encuentra junto a la cama para emitir una alerta si se llegaba a dicha reducción del 20% en cualquier momento en el período de estudio de 48 horas.

Las dosis originales seleccionadas fueron 200, 400 y 600 mg/kg con base en datos de estudios animales previos. El diseño de estudio original fue un estudio de 4 grupos con las 3 dosis y un placebo de control. Se registraron cinco pacientes y el Comité de Supervisión y Seguridad de los datos (DSMB, por sus siglas en inglés) observó inmediatamente que los niveles plasmáticos logrados con estas dosis fueron muy elevados, aunque no se observaron efectos adversos. Posteriormente, se cambió el diseño del estudio a un ensayo abierto con aumento de dosis a partir de 50 mg/kg y se aumentó la dosis en intervalos de 50 mg/kg. Cada paciente recibió 2 dosis: 1 dosis en el quirófano luego del inicio del baipás cardiopulmonar y una dosis 4 horas después, en la unidad de cuidados intensivos. Los datos se resumen en las Figuras 9A-9C.

Los pacientes 6 y 8 recibieron 50 mg/kg de citrulina intravenosa y presentaron un pico de nivel de citrulina de aproximadamente 220 $\mu\text{mol/l}$ y un nivel mínimo a 4 horas de 40 $\mu\text{mol/l}$. No se observaron efectos secundarios adversos. Este mínimo estaba por debajo del intervalo objetivo de 80–100 $\mu\text{mol/l}$ y, posteriormente, se aumentó la dosis. Los pacientes 9 y 10 recibieron 100 mg/kg de citrulina intravenosa y presentaron un pico de nivel de citrulina de 375 $\mu\text{mol/l}$ y un mínimo a 4 horas de 50 $\mu\text{mol/l}$. Nuevamente, no se observaron efectos secundarios adversos. Este mínimo también estaba por debajo del intervalo objetivo de 80–100 $\mu\text{mol/l}$ y, posteriormente, se aumentó la dosis. Los pacientes 13-16 recibieron 150 mg/kg de citrulina intravenosa y presentaron un pico de nivel de citrulina de 660 $\mu\text{mol/l}$ y un nivel mínimo a 4 horas de 80 $\mu\text{mol/l}$. Este mínimo a 4 horas estaba en el intervalo objetivo de 80–100 $\mu\text{mol/l}$ y no se aumentó adicionalmente la dosis. Se resume el perfil farmacocinético de estas 3 dosis de citrulina en las Figuras 10A-10B.

Se calculó que la semivida fue de aproximadamente 85 minutos, lo que fue demasiado breve para proceder con dosificación intermitente. Después del modelado farmacocinético, se cambió el diseño del estudio a una dosis en bolo de 150 mg/kg administrada en el quirófano en baipás cardiopulmonar, seguida 4 horas después de una infusión continua de 9 mg/kg/hora durante 48 horas. Se inscribieron 9 pacientes más. Se ilustran los niveles medios en plasma de citrulina y arginina en los pacientes en estudio (+IV citrulina) en comparación con los pacientes en la cohorte de observación (-IV citrulina) en las Figuras 11A-11B.

Hubo un evento adverso significativo, pero no se relacionó al uso de citrulina IV. El paciente desarrolló un paro bradicárdico aproximadamente 8 horas después de una reparación de AVSD no precedido por hipotensión sistémica. El paciente requirió asistencia de OMEC emergente durante 48 horas y, posteriormente, se recuperó totalmente y se autorizó su alta el día 22 de su hospitalización. El DSMB estudió el caso y determinó que no era probable que el evento adverso significativo se vinculara a la administración de citrulina.

Con base en tales datos, se determinó que la citrulina intravenosa era segura y que la combinación de un bolo de 150 mg/kg administrado en baipás cardiopulmonar al inicio de la cirugía seguido 4 horas después por una infusión continua de 9 mg/kg/h puede mantener el tono vascular pulmonar después de la cirugía y un suministro adecuado de citrulina en plasma.

EJEMPLO 6

FARMACOCINÉTICA DE L-CITRULINA INTRAVENOSA PERIOPERATORIA EN NIÑOS SOMETIDOS A CIRUGÍA CARDÍACA CONGÉNITA

Con el fin de determinar la eliminación de una única dosis en bolo de citrulina IV y la frecuencia de dosis óptima, se utilizó un diseño de aumento de dosis con tres concentraciones de citrulina IV: Se usaron 50, 100 y 150 mg/kg. La dosis de citrulina se administró en el quirófano inmediatamente después de la canulación y el inicio del baipás cardiopulmonar. El objetivo general fue lograr un nivel de citrulina sostenido de 100 $\mu\text{mol/l}$ o más hasta cuatro horas después de la dosis inicial. Se seleccionó el punto temporal a cuatro horas para permitir que se completara el procedimiento quirúrgico y que el paciente regresara a la unidad de cuidados intensivos (UCI) después de la cirugía antes de la administración de dosis adicionales. Se ilustran los datos compuestos de citrulina en la Figura 12.

A partir de estos datos, se determinó que la dosis óptima era 150 mg/kg dado que generó niveles a cuatro horas de cerca de 100 $\mu\text{mol/l}$. No hubo efectos adversos, lo que incluye hipotensión por la administración de cualquiera de las concentraciones de citrulina IV.

Sin embargo, a partir de los datos anteriores también se determinó que la semivida de las dosis en bolo de citrulina IV fue de aproximadamente 60-90 minutos y requeriría al menos 4 horas de dosificación, lo que es impráctico incluso en un entorno de UCI. El modelado farmacocinético sugirió que se podría lograr un nivel de citrulina sostenido de aproximadamente 100 $\mu\text{mol/l}$ mediante una dosis en bolo de 150 mg/kg de citrulina IV administrada al comienzo de la cirugía después del inicio del baipás cardiopulmonar seguida 4 horas después por una infusión continua de 9 mg/kg/h. Se ilustra el modelado farmacocinético de este régimen en la Figura 13.

Después se inscribieron pacientes con este protocolo revisado de una combinación de una dosis en bolo de 150 mg/kg en el quirófano en BCP y una infusión continua de 9 mg/kg/h iniciada después de la cirugía en la UCIP 4 horas después de la dosis en bolo inicial. Están disponibles los datos de citrulina de 9 pacientes y se presentan en las Figuras 14A-

14B. Esto muestra el mantenimiento de un adecuado suministro de citrulina en plasma.

EJEMPLO 7

5 ESTUDIO DE CITRULINA INTRAVENOSA

Un estudio de citrulina intravenosa llevado a cabo fue un estudio doble ciego aleatorizado controlado por placebo cuyo resultado clínico primario es la extensión de la ventilación mecánica postoperatoria y, en segundo lugar, la incidencia de la hipertensión pulmonar postoperatoria entre los 2 grupos de tratamiento (citrulina contra placebo).

Se inscribió un total de 77 pacientes en el hospital Vanderbilt Children's Hospital. Se seleccionaron los pacientes con base en el calendario quirúrgico. Con base en tal calendario, se seleccionaron los pacientes sometidos a una de las 5 cirugías cardíacas planificadas incluidas en este estudio (en este momento, se excluyen los pacientes sometidos al procedimiento de Norwood conforme a la recomendación del DSMB).

Se detuvo el estudio para preparar un ensayo controlado por placebo aleatorizado multicéntrico más grande. El análisis de los datos de estos 77 pacientes mostró que una mayoría que recibió citrulina no llegó al nivel de citrulina en plasma sostenido terapéutico objetivo de 100 $\mu\text{mol/l}$ principalmente debido a la remoción de citrulina mediante hemofiltración producida durante el baipás cardiopulmonar. Estas técnicas de hemofiltración habían cambiado durante el estudio y los investigadores no estaban al tanto de estos cambios.

EJEMPLO 8

25 PROTOCOLO PARA ADMINISTRACIÓN DE CITRULINA PARA CIRUGÍA CARDÍACA

El modelo farmacocinético original supuso un sistema cerrado. En ausencia de metabolismo significativo y emisión de orina durante la cirugía, el modelo supuso que los niveles terapéuticos logrados por el bolo original de citrulina se mantendrían durante la extensión de la cirugía. Sin embargo, en un punto desconocido temprano en el transcurso del estudio, la práctica de perfusión cambió para incorporar intercambio cristaloides y ultrafiltración agresiva durante el desarrollo de la cirugía. Esto significó que la ultrafiltración eliminó de forma eficaz la citrulina de la circulación, de forma que, al evaluar los niveles de citrulina, prácticamente ninguno de los pacientes había logrado niveles de fármacos terapéuticos.

Se llevó a cabo el estudio de este ejemplo para evaluar un protocolo de dosificación corregido diseñado para lograr y mantener niveles de citrulina terapéuticos ante la ultrafiltración y el reemplazo de cristaloides. Aunque, aparentemente, se cumplió con este criterio de valoración farmacocinético, esta presentación de datos se centra en los parámetros de eficacia evaluados como criterios de valoración secundarios. El estudio reclutó 22 pacientes asignados de forma aleatoria en cantidades iguales de 11 pacientes cada uno a los grupos de placebo y de citrulina.

40 *Resultados*

Se reconoció temprano en el desarrollo del estudio que uno de los dos centros participantes extubó como procedimiento de rutina a todos los pacientes en el quirófano inmediatamente después de la interrupción del baipás cardiopulmonar. Esto impidió usar la duración de la ventilación mecánica como un criterio de valoración. En su lugar, se aplicó un análisis posterior con la duración de todas las formas de asistencia de ventilación como criterio de valoración posible. La Figura 15 muestra que el grupo de control con placebo tiene una distribución aproximadamente bimodal de tiempos de ventilación, en el que algunos de los niños mantienen la asistencia respiratoria durante períodos extensos de tiempo. En contraste, los niños tratados con citrulina, salvo por la excepción de un caso atípico, mostraron una distribución unimodal con duraciones reducidas de asistencia respiratoria. Las diferencias entre los grupos de placebo y citrulina no llegaron a ser significativas, pero mostraron una tendencia fuerte cuando se aplicó una prueba de Satterthwaite. En contraste, el análisis de la tabla de contingencia que se ilustra en la Figura 16 logró una importancia en el límite. En general, se considera que los resultados representan una tendencia fuerte.

Tabla 6: Análisis de tabla de contingencia de efectos de citrulina conforme a la duración de la asistencia respiratoria

Duración de la asistencia respiratoria	Placebo	Citrulina
≤ 50 horas	3	7
> 50 horas	8	2

Los parámetros cardiovasculares proveen revelaciones adicionales. La Figura 17 muestra que los pacientes con citrulina mostraron de forma inesperada índices inotrópicos marcadamente mejores, en particular, de 15 a 18 horas en adelante luego del ingreso a la UCI. La presión sanguínea sistólica presentó una elevación transitoria leve en el grupo de citrulina alrededor de 20 horas después de interrumpir el baipás, mientras que las presiones diastólicas fueron esencialmente idénticas entre ambos grupos. Figura 18A. La presión arterial media mostró un leve aumento transitorio en el grupo de citrulina, tal como se ilustra en la Figura 18B, que refleja el cambio de presión sistólica. Dada la naturaleza de la elevación de la presión sanguínea sistólica y la elevación de la presión arterial, el aumento de la presión sistólica sugiere una posible necesidad menor de inotrópicos que la esperada.

La duración de la asistencia respiratoria total parece ser un criterio de valoración viable para el estudio de citrulina para evitar que la hipertensión pulmonar aguda complique la cirugía de reparación cardíaca congénita. No se observaron efectos adversos sobre los parámetros hemodinámicos.

EJEMPLO 9

FORMULACIÓN DE CITRULINA

Se puede producir citrulina estéril en primer lugar como un polvo a granel no estéril con un proceso de fermentación bacteriana (*Streptococcus faecalis*) de arginina, seguido de etapas de separación y extracción. Después, se reconstituye el polvo a granel no estéril y se somete a etapas de reducción de endotoxinas y filtración estéril seguidas de cristalización, secado y micronización en un entorno aséptico. Después, se usa el polvo a granel como «materia prima» para el relleno aséptico de viales de cristal para producir el fármaco terminado que se reconstituye con un diluyente estéril antes de su uso.

Cada vial estéril de citrulina para inyección puede contener alrededor de 300 mg de polvo de citrulina estéril. Se puede reconstituir cada vial con 6 ml de agua estéril para inyección, USP y se diluye adicionalmente con alrededor de 5.9 ml de cloruro de sodio al 0.9%, USP hasta un volumen de 12 ml y una concentración de 300 mg/12 ml = 25 mg/1 ml. Ejemplos de infusiones a pacientes pueden ser en cloruro de sodio al 0.9%, USP a administrar a una concentración de alrededor de 25 mg/ml.

EJEMPLO 10

FARMACOCINÉTICA (PK) Y SEGURIDAD DE ADMINISTRACIÓN DE L-CITRULINA IV A NIÑOS Y LACTANTES SOMETIDOS A BAIPÁS CARDIOPULMONAR (BCP) PARA REPARACIÓN QUIRÚRGICA DE DEFECTOS CARDÍACOS CONGÉNITOS

Se llevó a cabo un estudio simple ciego aleatorizado multicéntrico controlado por placebo de fase IB para determinar la farmacocinética (PK) y la seguridad de la administración de L-citrulina IV a niños y lactantes sometidos a baipás cardiopulmonar (BCP) para la reparación quirúrgica de defectos cardíacos congénitos.

El objetivo principal del estudio fue determinar si un protocolo corregido de administración de L-citrulina (IV) perioperatoria logró un nivel de citrulina en plasma de >100 µmol/l en el grupo al que se administró citrulina y comparar con los niveles de citrulina en el grupo de placebo durante el seguimiento de niños sometidos a reparación quirúrgica de una comunicación interauricular (ASD) y/o una comunicación interventricular (VSD) o una comunicación auriculoventricular (AVSD) parcial o total.

Analizar adicionalmente el perfil de seguridad de citrulina fue un objetivo de seguridad y establecer el impacto de la citrulina en los resultados clínicos postoperatorios fue un objetivo secundario.

Se inscribieron y se trataron 22 (veintidós) pacientes. Los pacientes recibieron infusiones del fármaco experimental o placebo de acuerdo con un protocolo de dosificación fijo a partir del inicio del BCP hasta 48 horas después de la cirugía o hasta la extracción de la vía arterial. La participación en el estudio finalizó con el alta o el día 28, lo que sucediera primero. Se diseñó el régimen de dosificación para mantener los niveles de citrulina en plasma ante hemofiltración extendida.

Se inscribieron y se trataron 22 (veintidós) pacientes. Los pacientes recibieron un bolo de citrulina IV de 150 mg/kg o placebo al inicio del BCP, seguido de la adición de L-citrulina a una concentración de 200 µmol/l o placebo al fluido de reemplazo de filtración o hemoconcentración usado durante el BCP. Se administró un bolo de citrulina de 20 mg/kg 30 después de la decanulación del BCP, inmediatamente seguido de una infusión continua de 9 mg/kg/h de citrulina o placebo durante 48 horas. La participación en el estudio finalizó con el alta o el día 28, lo que sucediera primero.

Los niveles de concentración de citrulina en plasma representaron la variable PK primaria y se evaluaron en muestras de sangre extraídas en 7 puntos temporales perioperatorios. Las variables PK secundarias fueron las concentraciones de metabolitos de óxido nítrico (NO) y arginina en el mismo conjunto de muestras. Se compararon los valores PK entre grupos.

Los sujetos recibieron un bolo de citrulina IV de 150 mg/kg o placebo al inicio del BCP, seguido de la adición de L-citrulina a una concentración de 200 $\mu\text{mol/l}$ o placebo al fluido de reemplazo de filtración o hemoconcentración usado durante el BCP. Se administró un bolo de citrulina de 20 mg/kg 30 minutos después de la decanulación del BCP, inmediatamente seguido de una infusión continua de 9 mg/kg/h de citrulina o placebo durante 48 horas.

Las evaluaciones de seguridad primarias incluyeron el monitoreo hemodinámico para identificar la hipotensión clínicamente significativa con límites específicos de edad. Se recabó información de eventos adversos y se registraron las hemorragias postoperatorias.

Se llevaron a cabo evaluaciones de seguridad, de laboratorio y clínicas adicionales desde la referencia hasta el alta, y las variables clínicas secundarias incluyeron: ventilación mecánica postoperatoria, duración de la asistencia respiratoria total, mejora hemodinámica, PVT postoperatoria mediante ecocardiograma, creatinina en suero y enzimas hepáticas, índice inotrópico, duración del uso de tubo torácico, extensión de la estadía en la unidad de cuidados intensivos, extensión de la hospitalización y supervivencia.

En este momento, el análisis de los resultados de estudio se encuentra en las etapas finales, pero no se ha completado todo el control de calidad, lo que significa que los datos que se encuentran más adelante pueden estar sujetos a cambios menores.

No obstante, los análisis detallados a continuación mostraron que es preferible al uso de una variable compuesta que comprende las duraciones más extensas de cada uno de estos parámetros como sustituto de la duración de la estadía en la unidad de cuidados intensivos. El motivo de dicha preferencia es que variables externas, tales como el momento del día y la disponibilidad de camas, entre otras, pueden influir en la duración real de la estadía en la UCI. Los pacientes que recibieron el fármaco experimental mostraron duraciones compuestas menores de ventilación mecánica y terapia inotrópica que los pacientes que recibieron placebo. Por lo tanto, tal como se evaluó mediante la variable marcadora sustituta compuesta, los pacientes que recibieron el fármaco experimental estuvieron listos para recibir el alta de la UCI antes que los pacientes que recibieron placebo. El protocolo de dosificación corregido logró niveles de citrulina en plasma constantemente sobre el nivel objetivo de 100 $\mu\text{mol/l}$, tal como se muestra a más adelante en la Figura 19. Los pacientes que recibieron citrulina mostraron una duración reducida de ventilación mecánica tal como se muestra en la Figura 20.

Se observaron algunas diferencias en la práctica clínica entre sitios con respecto a la ventilación mecánica. Un sitio tendió a extubar pacientes en el quirófano sin registrar el momento de extubación para dichos pacientes. A efectos de análisis, se fijó la duración de la ventilación mecánica postoperatoria en cero para dichos pacientes. Cuando estos pacientes se estratificaron por tratamiento, se mostró que los 6 pacientes (100%) que recibieron L-citrulina i.v. habían sido extubados en el quirófano, en comparación con solo 2 de 6 pacientes (33%) en el grupo de placebo.

Tal como con la extensión de tiempo de ventilación mecánica, la duración de la terapia inotrópica presentó diferencias marcadas entre los dos grupos de tratamiento, tal como se ilustra en la Figura 21.

En la Figura 21, se definen datos como el tiempo entre el momento de inicio y el momento de terminación del uso de inotrópicos. Todos los índices inotrópicos totales 0 o faltantes antes del primer índice medido se fijan en 0 y, por consiguiente, no se consideran como con inotrópicos. Se considera el índice inotrópico total, el que se calcula con base en Dopamina, Dobutamina, Milrinona, Epinefrina, Fenilefrina y Norepinefrina. Se fija en 0 horas (no censurados) la extensión de tiempo con inotrópicos de los pacientes que no reciben inotrópicos.

Tal como se mencionó anteriormente, la interrupción de la ventilación mecánica y de la terapia con inotrópicos son las dos determinantes principales de que el paciente se encuentra listo para el alta de la unidad de cuidados intensivos. Una variable compuesta que comprende (para cada sujeto) el mayor de los dos parámetros (duración de ventilación mecánica o de terapia inotrópica) puede servir como un sustituto eficaz y preciso de la duración de la estadía en la unidad de cuidados intensivos. La Figura 22 muestra las diferencias en la variable compuesta cuando se comparan los grupos de citrulina y placebo. Los pacientes que recibieron el fármaco experimental mostraron duraciones compuestas menores de ventilación mecánica y terapia inotrópica que los pacientes que recibieron placebo. Por lo tanto, tal como se evaluó mediante la variable marcadora sustituta compuesta, los pacientes que recibieron el fármaco experimental estuvieron listos para recibir el alta de la UCIP antes que los pacientes que recibieron placebo. Además de indicar un período más breve en la UCIP, un período de ventilación mecánica más breve reduce el riesgo agregado de daño físico.

Además de lograr los niveles de citrulina en plasma objetivo, este estudio arrojó resultados estadísticamente significativos y casi significativos que demuestran diferencias dependientes del tratamiento con citrulina en la duración

de la ventilación mecánica y la terapia inotrópica entre los grupos tratados y de control en un grupo pequeño de 22 sujetos.

5 La duración de la ventilación mecánica invasiva postoperatoria se deriva como el tiempo en horas desde la separación del baipás cardiopulmonar y la extubación endotraqueal. Si un paciente requirió reintubación dentro de un plazo de 24 horas desde la extubación, se sumó el tiempo de reintubación en el análisis principal. En un segundo análisis, no se incluyó el tiempo de reintubación.

10 La duración media de ventilación mecánica invasiva que incluye el tiempo de reintubación fue claramente más extensa en el grupo de placebo que en el grupo de tratamiento con citrulina, en los que los pacientes tratados con citrulina necesitaron solamente un promedio de 5 horas de ventilación invasiva mientras que los pacientes tratados con placebo necesitaron 37 horas (Tabla 8). La diferencia no llegó a tener importancia estadística en análisis ANOVA, más probablemente debido a la gran variación de duraciones en el grupo de placebo. Sin embargo, cuando se excluyó el tiempo de reintubación, la diferencia entre grupos aún fue importante y se logró importancia estadística en ANOVA ($p = 0.0317$). Se observó la importancia estadística de ambos análisis en la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon.

15 La interrupción de la ventilación de presión positiva y la terapia con inotrópicos son las dos determinantes principales de que el paciente se encuentra listo para el alta de la unidad de cuidados intensivos. Juntas, como una variable compuesta que comprende la mayor de la duración de asistencia de ventilación de presión positiva o de terapia con inotrópicos, pueden servir como un sustituto eficaz de la duración de la estadía en una unidad de cuidados intensivos. Esta última variable está sujeta a factores de confusión que la pueden prolongar accidentalmente, tal como la falta de disponibilidad de camas.

20 En resumen, los datos de este estudio muestran que el régimen de dosificación administrado logró el criterio de valoración farmacocinético. Además, a pesar del tamaño de muestra del estudio, este estudio demostró diferencias claras dependientes del tratamiento en favor de citrulina en la duración de la ventilación mecánica y la terapia con inotrópicos entre los grupos tratado y de control. En combinación en una variable compuesta, los resultados demuestran la eficacia terapéutica clínicamente significativa de la citrulina en cuanto al momento del alta de la unidad de cuidados intensivos. Por lo tanto, los resultados de este estudio indican que la administración de citrulina intravenosa puede cumplir una función beneficiosa en la prevención de secuelas clínicas de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar.

EJEMPLO 10A

ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Los niveles de concentración de citrulina durante y después del procedimiento de BCP fue el parámetro PK de interés en este estudio. El nivel objetivo en pacientes tratados con citrulina intravenosa fue un nivel de citrulina en plasma $>100 \mu\text{mol/l}$ durante el período de seguimiento inmediato después del BCP. La recolección de plasma sanguíneo se realizó en 7 puntos temporales perioperatorios: en el punto de referencia antes de la cirugía, durante el BCP (después de bolo 1) y después de la cirugía/BCP en los puntos temporales 0 horas (antes de bolo 2), 6 horas, 12 horas, 24 horas y 48 horas.

45 Las concentraciones media y mediana de citrulina en los respectivos tiempos temporales se resumen por grupo de tratamiento en la Tabla 7. A lo largo de todos los tiempos de muestreo con datos disponibles, la concentración media de citrulina en el grupo de tratamiento con citrulina superó el límite inferior especificado de $100 \mu\text{mol/l}$, mientras que las concentraciones medias de citrulina en el grupo de placebo estaban por debajo de este umbral en todos los puntos temporales analizados. Cabe señalar el alto valor de punto de referencia medio en el grupo de citrulina ($200.9 \mu\text{mol/l}$). Un paciente (02-004) en este grupo presentó un nivel de citrulina de punto de referencia de $1919 \mu\text{mol/l}$, es decir, antes del tratamiento con citrulina i.v. No hay información disponible sobre por qué el nivel de citrulina de punto de referencia fue tan alto para este paciente. Los datos disponibles indican que la muestra de referencia se extrajo antes del primer tratamiento con citrulina. Los valores de citrulina de punto de referencia en todos los demás pacientes en este grupo fueron notablemente inferiores, con una variación de 8 a $42 \mu\text{mol/l}$.

55

Tabla 7: Concentraciones de citrulina [$\mu\text{mol/l}$] en el transcurso del tiempo

Punto temporal de la muestra	Placebo (N=11)			Citrulina (N=11)		
	n	Media $\pm$ DE	Mediana	n	Media $\pm$ DE	Mediana
Punto de referencia	11	34.1 $\pm$ 7.50	34.0	11	200.9 $\pm$ 569.89	32.0
Post bolo 1	11	29.5 $\pm$ 5.96	28.0	11	2405.9 $\pm$ 1517.4	2577.0
Pre bolo 2	11	30.6 $\pm$ 10.46	28.0	11	890.9 $\pm$ 1077.5	573.0
Hora 6	11	24.1 $\pm$ 7.76	24.0	10	167.8 $\pm$ 117.67	138.0
Hora 12	9	19.9 $\pm$ 7.01	18.0	10	127.1 $\pm$ 16.18	125.0
Hora 24	9	12.9 $\pm$ 2.89	12.0	10	125.3 $\pm$ 38.74	114.0
Hora 48	4	12.3 $\pm$ 3.40	11.5	0 ^a	-	-

^aNo hay datos de muestreo de 48 horas disponibles para pacientes con citrulina. A un paciente (01-007) se le recolectó una muestra a las 46h, pero no se incluyó en el análisis de 48h dado que la muestra se consideró una evaluación no programada. Otro paciente (02-010) recibió infusión continua durante 47.5h, pero no hay datos disponibles para el punto temporal 48h.

DE = desviación estándar, N = cantidad de pacientes, n = cantidad de pacientes con datos disponibles.

Los valores de mediana de citrulina son, por lo tanto, más apropiados para ilustrar los cambios en las concentraciones de citrulina en el transcurso del tiempo. Los valores de mediana de citrulina durante el procedimiento de BCP y en el punto de referencia en comparación los posteriores a la cirugía se muestran de forma gráfica en la Figura 19. Se puede ver un aumento notable en la mediana de niveles de citrulina en el grupo de tratamiento con citrulina en comparación con el grupo con placebo en todos los puntos temporales de seguimiento posteriores al BCP.

Solo 5 del total de 59 muestras tomadas en el grupo de tratamiento de citrulina (excluyendo las muestras de punto de referencia) mostraron niveles de citrulina en plasma $\leq 100 \mu\text{mol/l}$ (Tabla 8). En comparación, todas las muestras tomadas de los pacientes tratados con placebo tuvieron niveles de citrulina $\leq 100 \mu\text{mol/l}$. Esta diferencia en concentraciones de citrulina fue altamente significativa desde el punto de vista estadístico ($p = 0.0006$).

Tabla 8: Muestras con concentraciones de citrulina $\geq 100 \mu\text{mol/l}$

	Cantidad de muestras con	Placebo (N=11)	Citrulina (N=11)
Sitio 01	Citrulina $\leq 100 \mu\text{mol/L}$	27	2
	Citrulina $> 100 \mu\text{mol/L}$	0	25
Sitio 02	Citrulina $\leq 100 \mu\text{mol/L}$	32	3
	Citrulina $> 100 \mu\text{mol/L}$	0	29
Valor-p CMH		0.0006	

Nota: Todas las muestras excepto la muestra de punto de referencia se usaron para el análisis. Prueba Cochrane-Mantel-Haenszel basada en si un paciente tenía algún valor de citrulina por encima de $100 \mu\text{mol/l}$.

La citrulina es la precursora de arginina y óxido nítrico. En la Tabla 9 se proporciona un resumen de valores de arginina y óxido nítrico en cada uno de los puntos temporales de muestreo.

Tabla 9: Concentraciones de arginina y óxido nítrico en el transcurso del tiempo

Punto temporal de la muestra	Placebo (N=11)			Citrulina (N=11)		
	n	Media $\pm$ DE	Mediana	n	Media $\pm$ DE	Mediana
Arginina [$\mu\text{mol/L}$]						
Punto de referencia	11	58.7 $\pm$ 12.37	55.0	11	49.6 $\pm$ 15.72	50.0
Post bolo 1	11	47.7 $\pm$ 7.43	46.0	11	72.6 $\pm$ 30.02	60.0
Pre bolo 2	11	67.1 $\pm$ 11.66	66.0	11	145.1 $\pm$ 47.94	141.0
Hora 6	11	47.3 $\pm$ 12.29	47.0	10	67.0 $\pm$ 22.66	66.5
Hora 12	9	39.0 $\pm$ 12.04	35.0	10	61.5 $\pm$ 17.37	57.5
Hora 24	9	28.1 $\pm$ 12.56	30.0	10	65.8 $\pm$ 18.80	64.0
Hora 48	4	34.5 $\pm$ 15.33	29.5	0	-	-
Óxido nítrico [$\mu\text{mol/L}$]						
Punto de referencia	11	69.5 $\pm$ 41.34	56.7	11	31.6 $\pm$ 13.51	36.6
Post bolo 1	11	51.3 $\pm$ 38.83	44.1	11	25.3 $\pm$ 12.76	25.0
Pre bolo 2	11	48.8 $\pm$ 29.16	38.4	11	30.7 $\pm$ 12.64	31.0
Hora 6	11	59.9 $\pm$ 45.59	37.5	10	32.0 $\pm$ 16.97	26.0
Hora 12	9	62.0 $\pm$ 42.89	51.5	10	26.6 $\pm$ 13.43	23.6
Hora 24	9	51.1 $\pm$ 42.58	46.8	10	29.1 $\pm$ 12.14	32.2
Hora 48	4	42.5 $\pm$ 17.48	48.9	0	-	-

DE = desviación estándar, N = cantidad de pacientes, n = cantidad de pacientes con datos disponibles.

Los valores de mediana también se muestran gráficamente en las Figuras 24A y 24B. A diferencia de la citrulina, la arginina en plasma en los pacientes tratados con citrulina solo se elevó ligeramente inmediatamente después del primer bolo de citrulina. Este desfase en el aumento en niveles de arginina probablemente refleja el tiempo necesario para que la citrulina esté disponible para la síntesis de arginina. En consecuencia, se muestra un notable aumento de arginina en pacientes tratados con citrulina en comparación con pacientes tratados con placebo en el punto temporal anterior al bolo 2. Después de la cirugía, los niveles de arginina en el grupo de citrulina permanecieron elevados a alrededor de 60 $\mu\text{mol/l}$, mientras que cayeron a alrededor de 30 $\mu\text{mol/l}$ en el grupo de placebo.

Los niveles de óxido nítrico en plasma permanecieron más o menos incambiados a lo largo de los puntos temporales de muestreo en cada uno de los grupos de tratamiento. Este resultado puede no ser sorprendente dado que la producción de óxido nítrico es un fenómeno local. Se espera que la adición de citrulina mejore la producción de NO local estrictamente regulada; sin embargo, el aumento probablemente no aparecería en una base molar en el torrente sanguíneo.

EJEMPLO 10B

VENTILACIÓN MECÁNICA INVASIVA POSTOPERATORIA

La duración de la ventilación mecánica invasiva postoperatoria se deriva como el tiempo en horas desde la separación del baipás cardiopulmonar hasta la extubación endotraqueal. Si un paciente requirió reintubación dentro de un plazo de 24 horas desde la extubación, se sumó el tiempo de reintubación en el análisis principal. En un segundo análisis, no se incluyó el tiempo de reintubación.

Solo un paciente en el grupo de placebo requirió reintubación. El paciente (02-011) primero se extubó en el día 4 después del final del BCP, pero fue reintubado el día siguiente y permaneció intubado por otros 6 días.

La duración media de ventilación mecánica invasiva que incluye el tiempo de reintubación fue claramente más extensa en el grupo de placebo que en el grupo de tratamiento con citrulina, en el que los pacientes tratados con citrulina necesitan solamente un promedio de 5 horas de ventilación invasiva mientras que los pacientes tratados con placebo necesitaron 37 horas (Tabla 10). La diferencia no llegó a tener importancia estadística en el análisis ANOVA, más probablemente debido a la gran variación de duraciones en el grupo de placebo. Sin embargo, cuando se excluyó el tiempo de reintubación, la diferencia entre el grupo aún fue importante y se logró importancia estadística en ANOVA ($p = 0.0317$). Se observó la importancia estadística de ambos análisis en la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon.

Tabla 10: Duración de ventilación mecánica invasiva [horas]

	Placebo (N=11)	Citrulina (N=11)	Dif. (CI) prueba-t valor-p Prueba de suma de rangos de Wilcoxon valor-p
Tiempo de reintubación incluido			32.0 (-9.5, 73.4) 0.1233
Media $\pm$ DE	37.1 $\pm$ 65.41	5.1 $\pm$ 8.15	
Mediana	21.7	0.0	
Intervalo	0.0 - 229.3	0.0 - 22.5	0.0222
Tiempo de reintubación excluido			19.5 (1.9, 37.2) 0.0317
Media $\pm$ DE	24.7 $\pm$ 26.83	5.1 $\pm$ 8.15	
Mediana	21.7	0.0	
Intervalo	0.0 - 92.3	0.0 - 22.5	0.0222

El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier confirmó la duración reducida de la ventilación mecánica invasiva en el grupo de citrulina, en comparación con el grupo de placebo. La Figura 25A-25B muestra la duración de ventilación mecánica para los dos grupos de tratamiento con tiempos de reintubación incluidos. El sitio 02 tendió a extubar pacientes en el quirófano (OR, por sus siglas en inglés) y generalmente no registró el momento de extubación para estos pacientes. De manera interesante, de 8 pacientes con una extubación en el quirófano en el Sitio 02, 6 habían recibido tratamiento con citrulina y solo 2 habían recibido placebo. En el primer análisis, la duración de la ventilación mecánica postoperatoria para estos pacientes se estableció en cero y todos los pacientes con tiempo de ventilación cero se censuraron (Figura 25A). En un segundo análisis, los pacientes con tiempo de ventilación cero no se censuraron (Figura 25B). Ambos análisis mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento en función de la prueba de intervalo logarítmico ($p = 0.0498$ y $p = 0.0089$, respectivamente).

Las curvas de Kaplan Meier para la duración de ventilación mecánica invasiva excluyendo el tiempo de reintubación en un paciente se muestran en la Figura 26A-26B. Los resultados confirmaron la ventaja del tratamiento con citrulina sobre el de placebo y mostraron importancia estadística a favor de la citrulina en ambos análisis.

EJEMPLO 10C

ASISTENCIA RESPIRATORIA TOTAL

El análisis de asistencia respiratoria total incluye cualquier asistencia respiratoria invasiva y no invasiva necesaria durante el período de estudio. La duración total media de asistencia respiratoria en el grupo de tratamiento con citrulina fue menor que la mitad de la duración en el grupo de tratamiento con placebo; la diferencia fue estadísticamente significativa (Tabla 11).

Tabla 11: Duración total de asistencia respiratoria [horas]

	Placebo (N=11)	Citrulina (N=11)	Dif. (CI) prueba-t valor-p
			Prueba de suma de rangos de Wilcoxon valor-p
n	11	11	50.7 (5.4, 96.0)
Media $\pm$ DE	81.9 $\pm$ 66.23	31.2 $\pm$ 28.27	0.0301
Mediana	73.1	23.6	
Intervalo	4.0 - 229.3	0.0 - 100.1	0.0418

n = pacientes con datos disponibles.

Las gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier que confirman la ventaja del tratamiento de citrulina sobre el de placebo se muestran para todos los pacientes (sin censura) y para los pacientes sin asistencia respiratoria censurados en las Figuras 27A-27B.

EJEMPLO 10D

DURACIÓN EN TIEMPO CON INOTRÓPICOS E ÍNDICE INOTRÓPICO

La duración en tiempo con inotrópicos IV se documentó desde el momento del primer uso después de la cirugía hasta la finalización de la medicación del estudio a las 48 horas, es decir, la duración del uso de inotrópicos fue de un máximo de 48 horas en el análisis actual. Los pacientes que todavía estaban recibiendo inotrópicos en la hora 48 después de la cirugía se censuraron. La duración promedio de uso de inotrópicos intravenosos (IV) fue claramente más baja en el grupo de citrulina que en el grupo de placebo (Tabla 12). Sin embargo, no se alcanzó importancia estadística para la diferencia entre tratamientos.

Tabla 12: Duración de inotrópicos intravenosos [horas]

	Placebo (N=11)	Citrulina (N=11)	Dif. (CI) prueba-t valor-p
			Prueba de suma de rangos de Wilcoxon valor-p
Duración de tiempo con inotrópicos i.v.			12.7 (-2.6, 28.1)
Media $\pm$ DE	26.1 $\pm$ 19.38	13.4 $\pm$ 14.78	0.0987
Mediana	23.0	16.0	
Intervalo	0.0 - 48.0	0.0 - 47.0	0.0727

Las gráficas de análisis de supervivencia para la duración de tiempo con inotrópicos intravenosos (IV) se presentan en la Figura 28A-28B. El análisis de Kaplan-Meier primario censuró a los pacientes que todavía estaban usando inotrópicos en la hora 48, pero no aplicó ninguna censura adicional (Figura 27A). Un segundo análisis también censuró a pacientes sin uso de inotrópicos, es decir, tiempo de inotrópicos=0 (Figura 27B). Ambos análisis mostraron marcadas diferencias en la duración del uso de inotrópicos entre los grupos de citrulina y placebo. La ventaja del tratamiento de citrulina sobre el tratamiento de placebo fue estadísticamente significativa en el análisis principal sin ninguna censura adicional ($p = 0.0351$, prueba de intervalo logarítmico).

Se realizó un tercer análisis de Kaplan-Meier omitiendo a los pacientes con duración cero de uso de inotrópicos i.v. Los resultados fueron idénticos a aquellos para la población general con tiempo = 0 censurado. El índice inotrópico total, que resume el uso de todos los inotrópicos intravenosos (IV) después de la cirugía, fue notablemente más bajo en el grupo de citrulina en comparación con el grupo de placebo (Tabla 13). La diferencia en índice inotrópico fue evidente durante todo el tiempo postoperatorio analizado (Figura 29). La ventaja para la citrulina en el uso de inotrópicos en función del índice inotrópico total fue estadísticamente significativa en un ANOVA de mediciones repetidas ($p = 0.0438$).

Tabla 13: Índice inotrópico:

	Placebo (N=11)	Citrulina (N=11)	Dif. (CI) prueba-t valor-p Prueba de suma de rangos de Wilcoxon valor-p
Índice inotrópico total			559.8 (-193.5, 1313.2)
Media $\pm$ DE	1162.6 $\pm$ 951.31	602.7 $\pm$ 727.86	0.1368
Mediana	1000.0	650.0	0.1271
Intervalo	0.0 - 2617.1	0.0 - 2351.0	

EJEMPLO 10E

5 MEDICAMENTOS VASOACTIVOS

La cantidad total de horas con medicamentos vasoactivos, que incluyen nitroglicerina, nitroprusiato y vasopresina, se calculó desde el final de la cirugía hasta la interrupción de los medicamentos vasoactivos o final de la medicación del estudio (Hora 48), lo que haya ocurrido primero. La Tabla 14 compara la duración de tiempo con medicamentos vasoactivos para los grupos de tratamiento de citrulina y placebo. La duración general de tratamiento vasoactivo simultáneo fue más corta en pacientes tratados con citrulina que en los tratados con placebo, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. Se muestran resultados similares para el índice vasoactivo total. Sin embargo, el paciente que recibió citrulina de hecho mostró una duración total de medicación vasoactiva más corta como se muestra en la Figuras 30A-30B.

Tabla 14: Uso de medicamentos vasoactivos

	Placebo (N=11)	Citrulina (N=11)	Dif. (CI) prueba-t valor-p Prueba de suma de rangos de Wilcoxon valor-p
Duración de tiempo con medicamentos vasoactivos [horas]			3.5 (-7.0, 14.1)
Media $\pm$ DE	9.8 $\pm$ 15.09	6.3 $\pm$ 7.18	0.4898
Mediana	0.0	1.0	0.9720
Intervalo	0.0 - 48.0	0.0 - 17.0	
Índice vasoactivo total			5.2 (-7.7, 18.0)
Media $\pm$ DE	10.6 $\pm$ 17.42	5.5 $\pm$ 10.62	0.4125
Mediana	0.0	1.1	0.8884
Intervalo	0.0 - 56.0	0.0 - 35.5	

EJEMPLO 10F

20 DURACIÓN DE ESTADÍA EN UCI

La duración de la estadía en UCI se analizó una vez como la cantidad total de horas postoperatorias pasadas en la UCI y una vez como la cantidad total de horas postoperatorias que un paciente necesitó ventilador mecánico o inotrópico intravenoso continuo o ayuda de vasodilatadores postoperatorios. La última combinación de parámetros representa otro criterio de valoración sustituto para la estadía en UCI.

Usando cualquiera de las definiciones, la duración de la estadía en UCI fue claramente más larga para pacientes tratados con placebo que para pacientes tratados con citrulina (Tabla 15). Excluyendo el tiempo de reintubación para un paciente en el grupo de placebo, la duración de estadía en UCI en pacientes tratados con citrulina aún fue de solamente alrededor de la mitad de extensión que la duración para los pacientes tratados con placebo. La importancia estadística para la diferencia entre tratamientos se mostró en la prueba Wilcoxon.

Tabla 15: Duración de estadía en UCI

	Placebo (N=11)	Citrulina (N=11)	Dif. (CI) prueba-t valor-p Prueba de suma de rangos de Wilcoxon valor-p
Duración de estadía en UCIP [horas]			69.14 (-49.39, 187.67)
Media $\pm$ DE	105.08 $\pm$ 187.762	35.94 $\pm$ 16.150	0.2379
Mediana	48.77	28.52	0.1891
Intervalo	20.1 - 666.2	20.8 - 72.0	
Duración más larga de ventilación mecánica, uso de inotrópicos i.v. o uso de vasodilatador - reintubación incluida [horas]			29.9 (-11.0, 70.9)
Media $\pm$ DE	44.4 $\pm$ 63.62	14.5 $\pm$ 13.99	0.1430
Mediana	23.0	15.0	
Intervalo	0.0 - 229.3	0.0 - 47.0	0.0479
Duración más larga de ventilación mecánica, uso de inotrópicos i.v. o uso de vasodilatador - reintubación excluida [horas]			17.5 (-1.2, 36.2)
Media $\pm$ DE	32.0 $\pm$ 26.26	14.5 $\pm$ 13.99	0.0653
Mediana	23.0	15.0	
Intervalo	0.0 - 92.3	0.0 - 47.0	0.0479

Las gráficas de Kaplan-Meier de la duración total de estadía en UCIP así como de la duración de estadía en UCI de acuerdo con la definición de estadía más larga se muestran en las Figuras 31-32B. Particularmente el análisis de supervivencia de la definición de estadía en UCI más larga confirmó la ventaja de la citrulina sobre el placebo, con importancia estadística mostrada en ambos análisis.

EJEMPLO 10G

CRITERIO DE VALORACIÓN COMPUESTO

La interrupción de la ventilación de presión positiva y de la terapia con inotrópicos son las dos determinantes principales de que el paciente se encuentra listo para el alta de la unidad de cuidados intensivos. Se combinaron como una variable compuesta para que sirvan como un criterio de valoración adicional eficaz sustituto para la duración de la estadía en UCI.

El criterio de valoración compuesto comprendió el más largo de la duración de asistencia de ventilación de presión positiva o de terapia con inotrópicos. Dado que el uso de inotrópicos solo se documentó hasta la hora 48 después de la cirugía (final del tratamiento del medicamento del estudio), los pacientes que continuaban con uso de inotrópicos hasta la hora 48 y con duración de ventilación mecánica ≤ 48 h se censuraron en este punto temporal. Si la ventilación mecánica se continuó más allá del punto temporal de 48 horas, la duración de la ventilación mecánica se usó en el análisis.

La Tabla 16 resume los resultados del criterio de valoración compuesto con inclusión y exclusión del tiempo de reintubación para el paciente en el grupo de placebo que necesitó reintubación para ventilación mecánica adicional. También, para la necesidad de combinación de ventilación mecánica invasiva e inotrópicos, hubo una clara ventaja para la citrulina en comparación con el tratamiento con placebo. Las diferencias entre tratamientos fueron estadísticamente significativas en la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon.

Tabla 16: Análisis compuesto de duración de ventilación mecánica invasiva o uso de inotrópicos [horas]

	Placebo (N=11)	Citrulina (N=11)	Dif. (CI) prueba-t valor-p Prueba de suma de rangos de Wilcoxon valor-p
Tiempo de reintubación incluido			30.2 (-10.8, 71.1)
Media $\pm$ DE	44.4 $\pm$ 63.62	14.3 $\pm$ 14.06	0.1403
Mediana	23.0	15.0	0.0479
Intervalo	0.0 - 229.3	0.0 - 47.0	
Tiempo de reintubación excluido			17.7 (-1.0, 36.4)
Media $\pm$ DE	32.0 $\pm$ 26.26	14.3 $\pm$ 14.06	0.0625
Mediana	23.0	15.0	0.0479
Intervalo	0.0 - 92.3	0.0 - 47.0	

Las gráficas de Kaplan-Meier del criterio de valoración compuesto se presentan con los tiempos de reintubación incluidos y excluidos en las Figuras 33A-33B. En ambos análisis, los pacientes con uso de inotrópicos todavía en curso a las 48 horas y ventilación mecánica de menos de 48 horas se censuraron. En ambos análisis, los pacientes tratados con citrulina estadísticamente necesitaron significativamente menos ventilación mecánica o inotrópicos que los

EJEMPLO 10H

DURACIÓN DE HOSPITALIZACIÓN

La duración de la hospitalización se calculó como la cantidad total de días después de la cirugía hasta el alta del hospital. La duración promedio de hospitalización fue más baja en el grupo de tratamiento de citrulina que en el de placebo, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 17).

Tabla 17: Duración de hospitalización

	Placebo (N=11)	Citrulina (N=11)	Dif. (CI) prueba-t valor-p
			Prueba de suma de rangos de Wilcoxon valor-p
Duración de hospitalización (días)			3.7 (-2.2, 9.7)
Media $\pm$ DE	8.4 $\pm$ 9.38	4.6 $\pm$ 1.21	0.2062
Mediana	5.0	5.0	0.2637
Intervalo	4.0 - 36.0	3.0 - 7.0	

FARMACOCINÉTICA Y RESULTADOS CLÍNICOS PARA LOS EJEMPLOS 10A-10H

Los resultados de los análisis de PK y resultados clínicos en los EJEMPLOS 10A-10H mostraron que ya sea como resultados estadísticamente significativos o como fuertes tendencias que respaldan que los protocolos descritos en la presente se pueden usar para mantener los niveles de citrulina en plasma y, en consecuencia, reducir la incidencia y gravedad de lesión pulmonar por baipás cardiopulmonar. Los métodos descritos en la presente lograron los niveles de citrulina en plasma objetivo $>100 \mu\text{mol/l}$ en pacientes que recibieron citrulina. La duración de ventilación mecánica se redujo en pacientes que recibieron citrulina en comparación con pacientes que recibieron placebo. La duración del uso de inotrópicos para apoyar el gasto cardíaco se redujo en pacientes que recibieron citrulina en comparación con pacientes que recibieron placebo. La duración general de tratamiento con medicación vasoactiva simultánea fue más corta en pacientes tratados con citrulina que con placebo. La necesidad general de asistencia respiratoria fue más baja en el grupo de tratamiento de citrulina en comparación con el de placebo. Los pacientes que recibieron el fármaco experimental presentaron duraciones compuestas menores de ventilación de presión positiva y terapia con inotrópicos que los pacientes que recibieron placebo. Por lo tanto, tal como se evaluó mediante la variable marcadora sustituta compuesta, los pacientes que recibieron citrulina estuvieron listos para recibir el alta de la UCI antes que los pacientes que recibieron placebo. Esto también se mostró en análisis de la duración de la estadía en UCI y en el análisis de la duración más larga de ventilación mecánica, uso de inotrópicos i.v. o uso de vasodilatador. De manera similar, la duración general de la hospitalización fue más corta para los pacientes tratados con citrulina en comparación con los

Los métodos descritos en la presente que comprenden la administración de L-citrulina IV suministrada de forma perioperatoria alcanzaron un nivel de citrulina en plasma de $>100 \mu\text{mol/l}$ durante el seguimiento en niños sometidos a reparación quirúrgica de una comunicación interauricular (ASD) y/o una comunicación interventricular (VSD) o una comunicación auriculoventricular (AVSD) parcial o completa. Además, el tratamiento con citrulina condujo a una inesperada disminución del PVT y en consecuencia de la necesidad de ventilación mecánica invasiva postoperatoria prolongada asociada con la reparación quirúrgica de lesiones cardíacas congénitas.

Los resultados muestran que las dosis administradas (bolo e infusión) de citrulina IV alcanzaron sostenidos niveles elevados de citrulina en plasma por encima del nivel objetivo. A lo largo de todos puntos temporales de muestreo analizados, la concentración media de citrulina en el grupo de tratamiento con citrulina superó el límite inferior especificado de $100 \mu\text{mol/l}$, mientras que las concentraciones medias de citrulina en el grupo de placebo estaban por debajo de este umbral en todos los puntos temporales analizados. La diferencia en la cantidad de muestras con concentraciones de citrulina por encima del nivel objetivo fue altamente significativa desde el punto de vista estadístico ($p = 0.0006$) a favor del tratamiento de citrulina.

Los pacientes que recibieron citrulina de acuerdo con los métodos descritos en la presente también mostraron duraciones compuestas más cortas de ventilación mecánica y terapia con inotrópicos que los pacientes que recibieron placebo. Por lo tanto, tal como se evaluó mediante la variable marcadora sustituta compuesta, los pacientes que recibieron el fármaco experimental estuvieron listos para recibir el alta de la UCI antes que los pacientes que recibieron placebo.

Los niveles de óxido nítrico (NO) no cambiaron notablemente durante el tratamiento con citrulina o placebo. Este hallazgo puede explicarse por la producción local de óxido nítrico. Se espera que el tratamiento con citrulina mejore la producción local de NO estrictamente regulada, pero los cambios en NO pueden no ser registrables en el torrente sanguíneo.

5 Los datos de seguridad recolectados en el estudio mostraron que la administración de L citrulina era segura y no se produjeron eventos adversos y /o eventos adversos graves inesperados en este tratamiento. Todos los pacientes (100%) del grupo de citrulina y 73% de los pacientes en el grupo de placebo experimentaron al menos un evento adverso que surge del tratamiento. En pacientes tratados con citrulina, los eventos adversos más frecuentes fueron efusión pleural (36%), taquipnea (27%), hipertensión (27%) e hipotensión (27%). Los eventos adversos más frecuentes en el grupo de placebo fueron efusión pleural (45%), hipertensión (36%), ritmo nodal (27%) y vómitos (27%). No se informó ningún evento adverso que condujera a la muerte, ningún evento adverso grave y ningún evento adverso que condujera a la suspensión.

15 No hubo diferencia en la hemorragia postoperatoria entre los 2 grupos de tratamiento, según lo indicado por la extensión y volumen del drenaje del tubo torácico. El tratamiento del estudio no tuvo impacto evidente en la mayoría de los parámetros de laboratorio investigados por razones de seguridad. Hasta 24 horas después del comienzo del tratamiento, los niveles de AST así como la concentración de bilirrubina total al menos se duplicaron en ambos grupos de tratamiento, mientras que niveles medios de ALKP. El nitrógeno ureico en sangre (BUN, por sus siglas en inglés) permaneció estable en el grupo de placebo, mientras que aumentó desde el punto de referencia hasta el Día 2 en el grupo de citrulina ($p=0.0111$).

25 El ritmo cardíaco fue constantemente más alto en el grupo de placebo que en el grupo de citrulina. No hubo impacto destacable del tratamiento en la saturación de oxígeno o presión sanguínea arterial sistémica. En general, los resultados de este estudio indican que la administración intravenosa de citrulina de acuerdo con los métodos descritos en el presente tratamiento puede desempeñar una función beneficiosa en la prevención de las secuelas clínicas de lesión pulmonar inducida por BCP al impedir el desacoplamiento de la enzima eNOS durante la cirugía.

30 Aunque la invención que antecede se ha descrito en conexión con esta modalidad preferida, no se limita a esta, sino que únicamente la limitará el alcance de las reivindicaciones que se encuentran a continuación.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso en un método para mantener el acoplamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) para reducir la incidencia o gravedad de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar debida a la formación de radicales libres en un paciente durante el baipás cardiopulmonar en una cirugía que comprende administrar una cantidad eficaz de citrulina al paciente antes, durante y después de la cirugía, caracterizado por que, durante la cirugía, la citrulina se administra al inicio de la cirugía a 100-500 mg/kg de citrulina, después de lo cual se administra de nuevo una cantidad eficaz de la citrulina durante la cirugía, en donde dicha cantidad eficaz de la citrulina administrada durante la cirugía se añade a un fluido de reemplazo de hemoconcentración proporcionado al paciente como parte del baipás cardiopulmonar, y en donde la cantidad eficaz de citrulina es una cantidad suficiente para reducir el desacoplamiento de eNOS.
2. La composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso de la reivindicación 1, caracterizada por que la cantidad eficaz de citrulina es una cantidad suficiente para reducir la formación de radicales libres.
3. La composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizada por que la cantidad eficaz de citrulina es una cantidad suficiente para reducir la incidencia o gravedad de lesión pulmonar inducida por baipás cardiopulmonar.
4. La composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizada por que la citrulina se administra al paciente antes de la cirugía, a 12 horas antes de la cirugía.
5. La composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la cirugía es para corregir un defecto cardíaco, preferentemente un defecto cardíaco asociado con exceso de flujo sanguíneo pulmonar, un defecto del tabique auricular, un defecto de tabique arterial grande, un defecto del tabique ventricular, una comunicación interventricular no restrictiva grande (VSD), una lesión de ventrículo único, una lesión de ventrículo único reparada mediante los procedimientos de Glenn y Fontan, estenosis de la válvula aórtica (AVS), comunicación interauricular (ASD), coartación de la aorta (CoA), defecto del canal auriculoventricular completo (CAVC), d-Transposición de las grandes arterias, anomalía de Ebstein, l-transposición de las grandes arterias, conducto arterioso persistente (PDA), estenosis de la válvula pulmonar, defectos del ventrículo único, tetralogía de Fallot, conexión venosa pulmonar anómala total (CVPAT), Tronco arterioso o comunicación interventricular (VSD), preferentemente la cirugía es un procedimiento de cambio arterial, o el baipás cardiopulmonar es para reparar una comunicación interauricular (AVSD) parcial o completa, o el bypass cardiopulmonar es para reparar una comunicación interauricular del *ostium primum* (ASD primum).
6. La composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizada por que la citrulina se administra después de la cirugía, durante 12-48 horas después de la cirugía, a una concentración de 100-500 $\mu\text{mol/l}$, opcionalmente a una concentración de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 $\mu\text{mol/l}$, y opcionalmente a una velocidad de administración de 3-12 mg/kg/hora.
7. La composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizada por que la citrulina se administra por vía oral, intravenosa, por inhalación o una combinación de éstas.
8. La composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizada por que el nivel de citrulina en plasma del paciente se eleva por encima de 37, 50, 100, 150 o 200 $\mu\text{mol/l}$.
9. La composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizada por que el nivel de citrulina en plasma del paciente se eleva por encima de 37, 50, 100, 150 o 200 $\mu\text{mol/l}$ después de la cirugía.
10. La composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizada por que el paciente es un niño prematuro, un neonato, preadolescente, adolescente o un adulto.
11. La composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizada por que la estadía en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del paciente disminuye.
12. La composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizada por que la estadía en la UCI del paciente disminuye a menos de 27 días.
13. La composición farmacéutica que comprende citrulina para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el paciente está en riesgo de insuficiencia cardíaca derecha aguda, regurgitación tricúspide, hipotensión sistémica, isquemia de miocardio, resistencia de las vías respiratorias aumentada o hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (PPHN), o está en riesgo de, o tiene, lesión pulmonar aguda o hipertensión pulmonar postoperatoria.

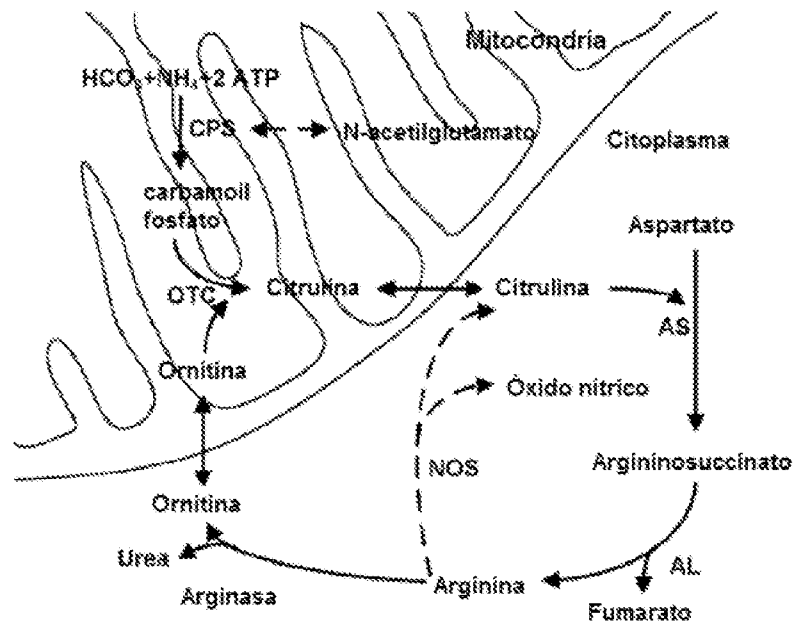


Figura 1

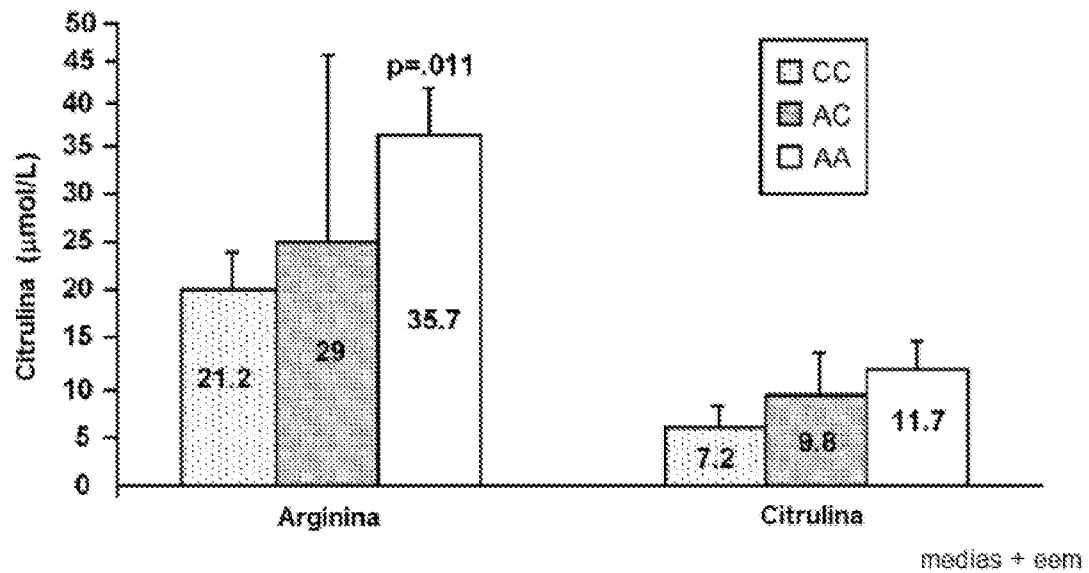


Figura 2

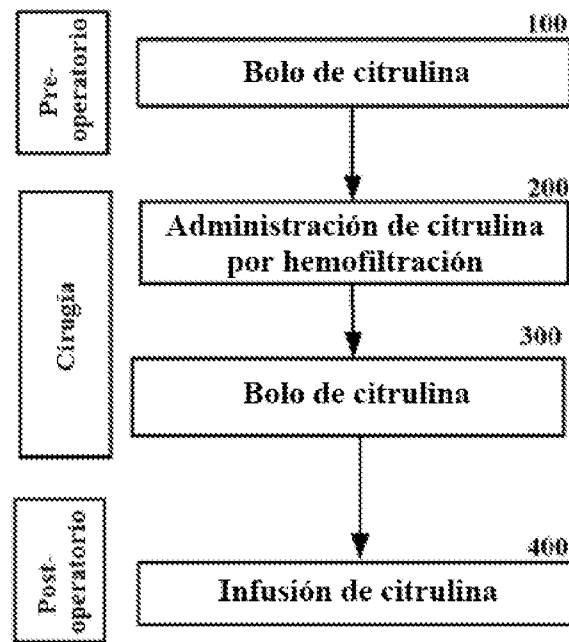


Figura 3

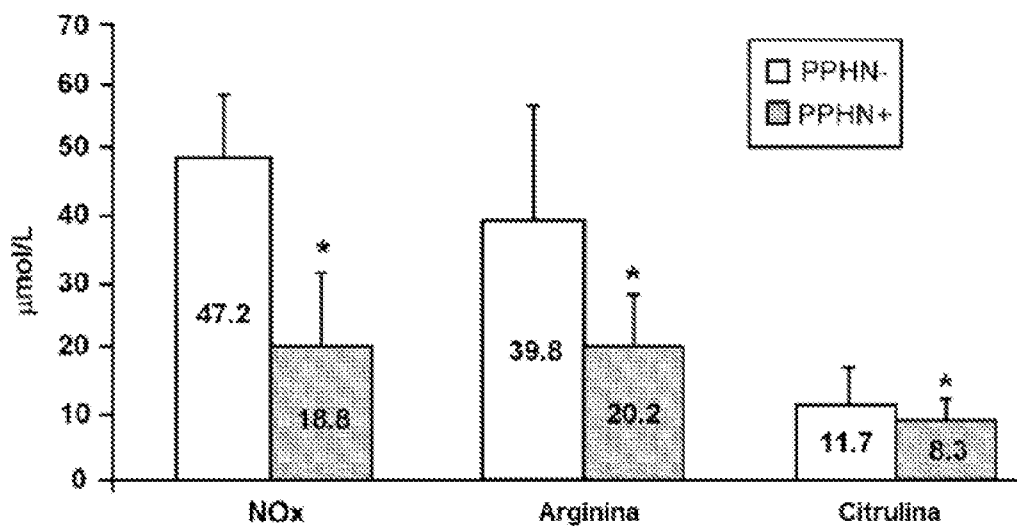


Figura 4

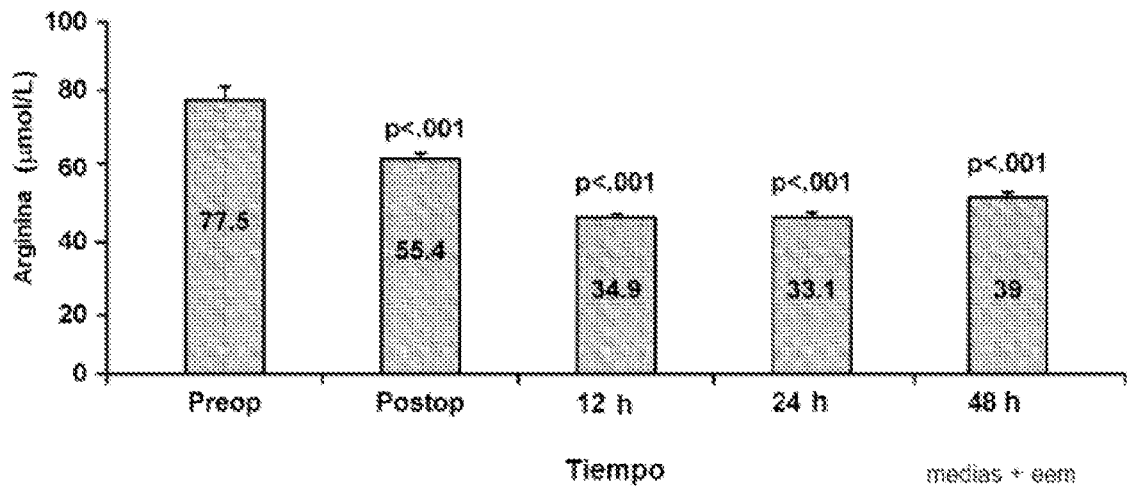


Figura 5

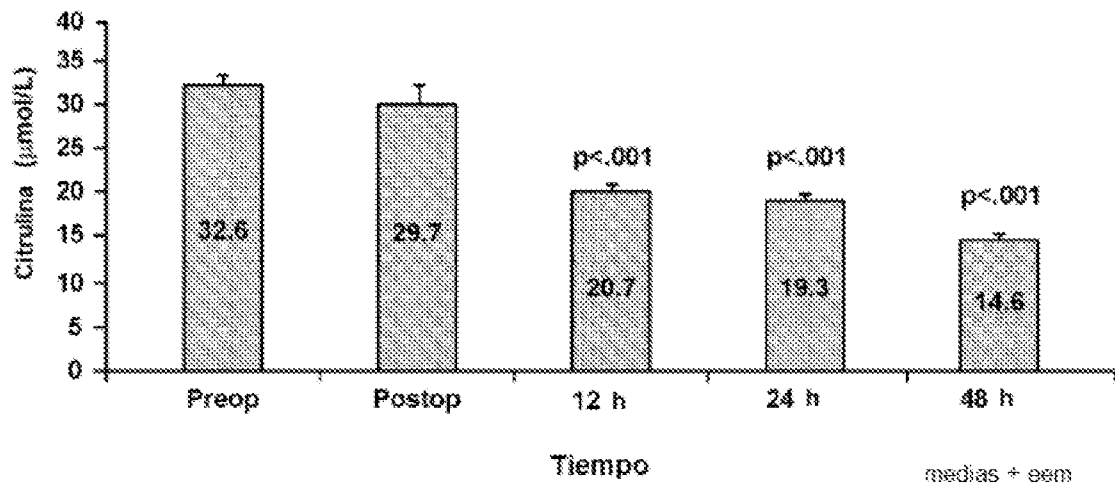


Figura 6A

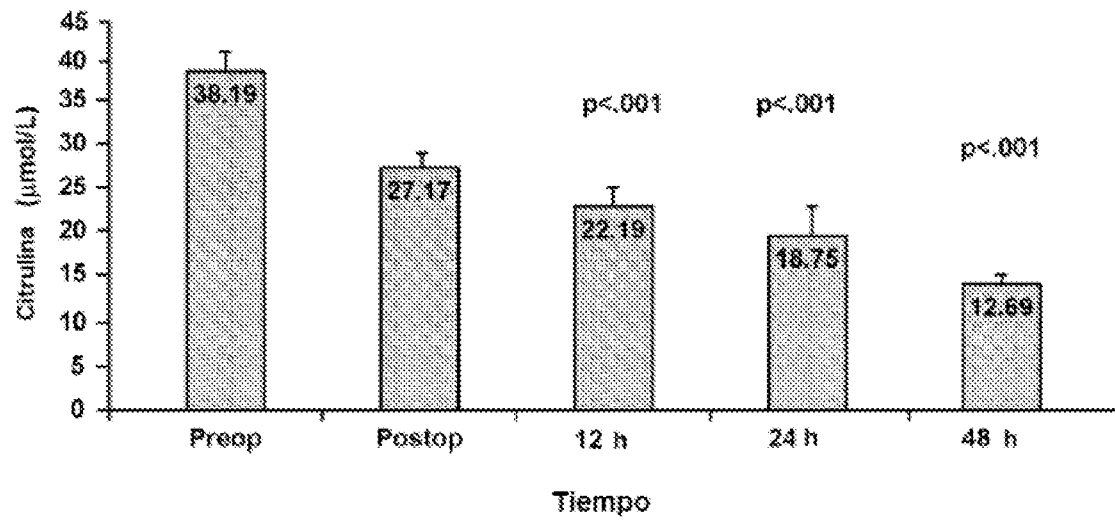


Figura 6B

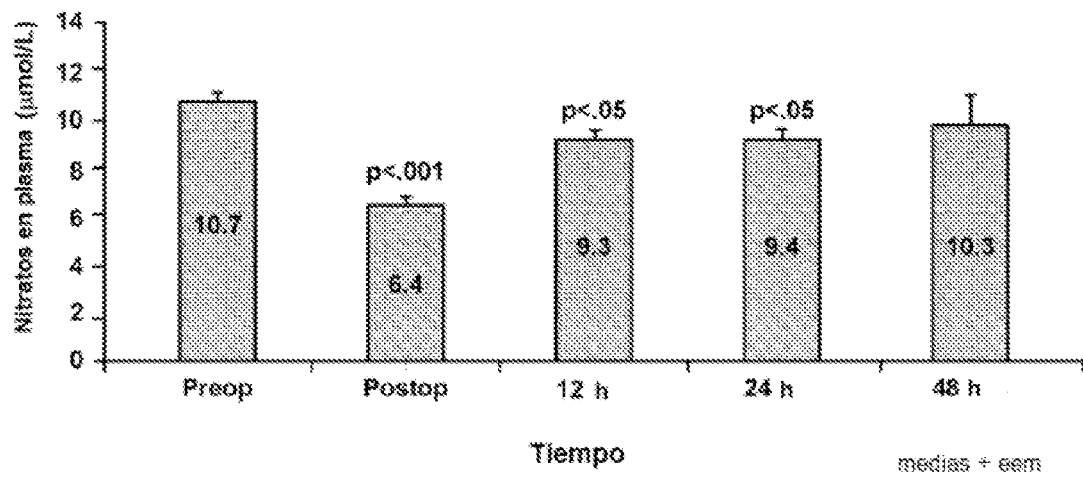


Figura 7

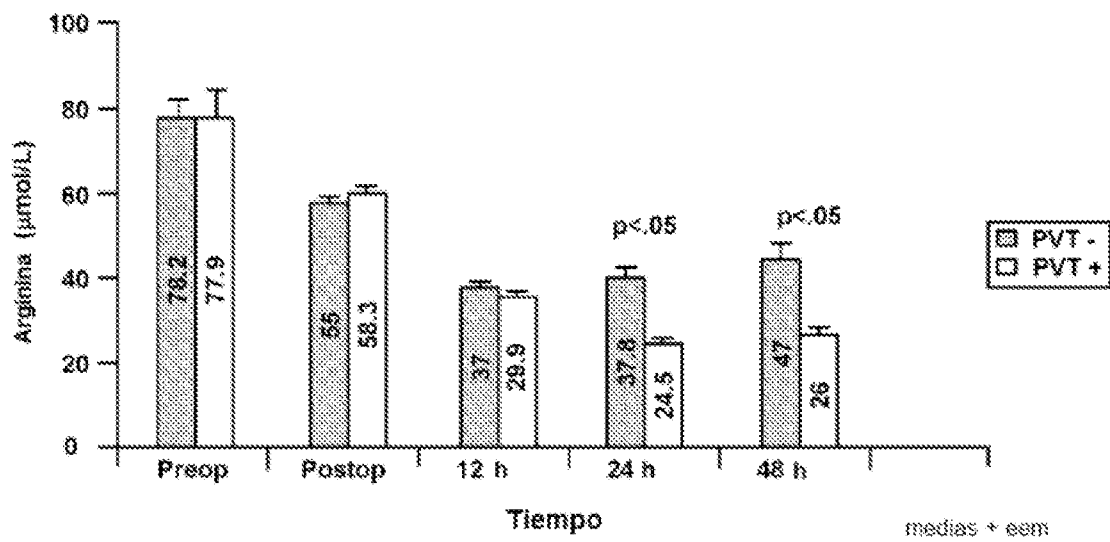


Figura 8

Figura 9A

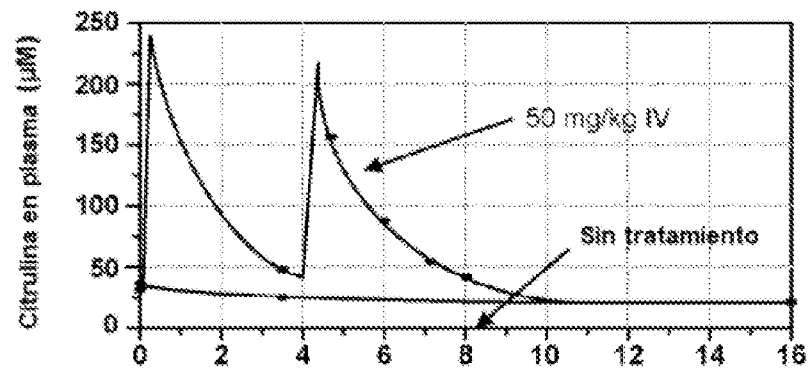


Figura 9B

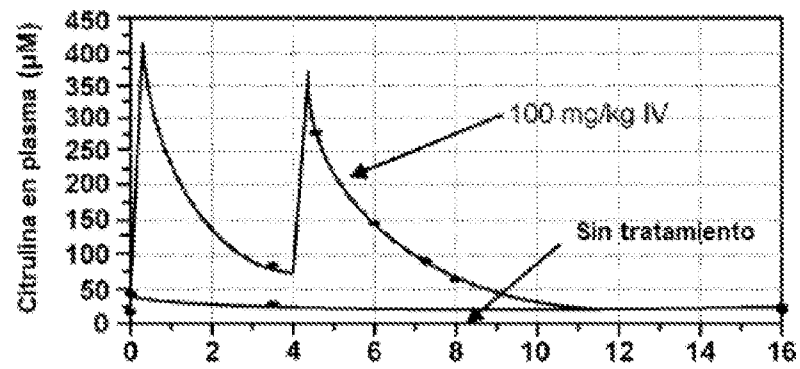
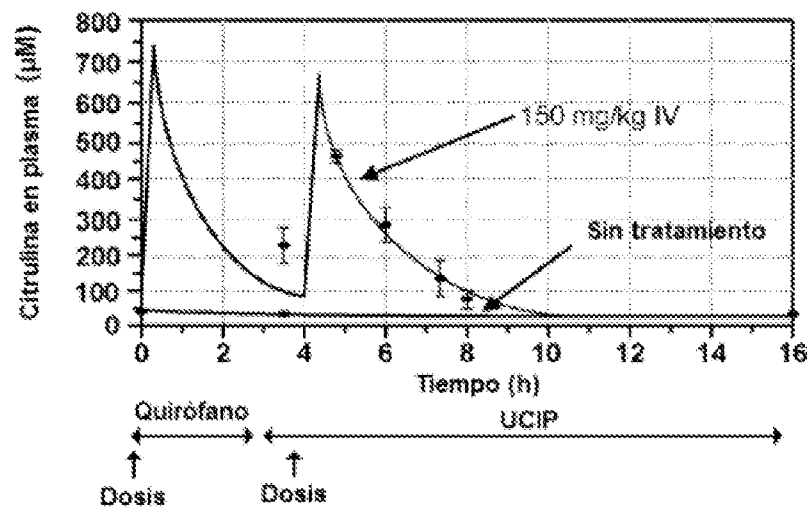
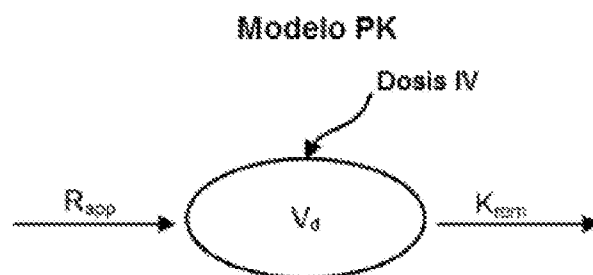


Figura 9C



**Figura 10A**

Parámetros PK

Dosis (mg/kg)	R_{app} ($\mu\text{mol/hr/kg}$)	K_{elim} (hr^{-1})	V_d (L/kg)
50	21.3	0.69	1.36
100	22.3	0.69	1.44
150	20.1	0.72	1.17

Figura 10B

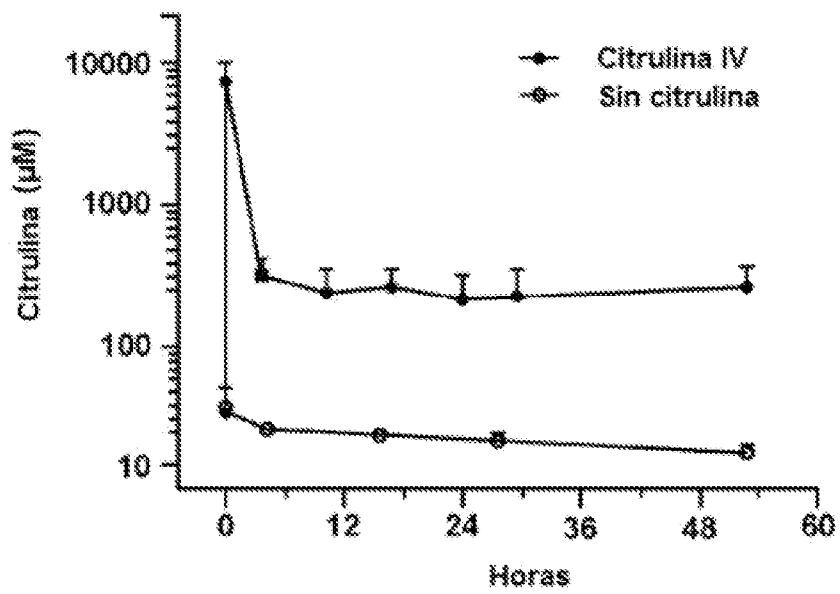


Figura 11A

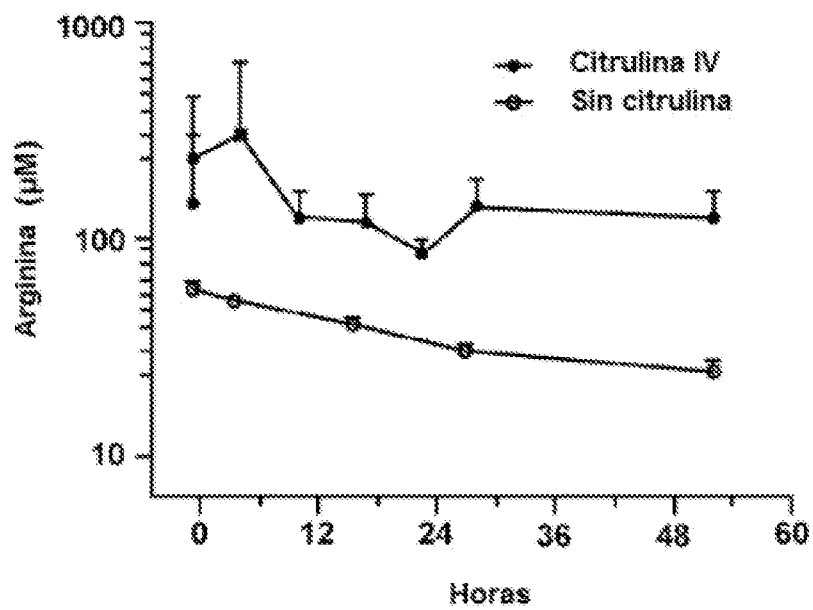


Figura 11B

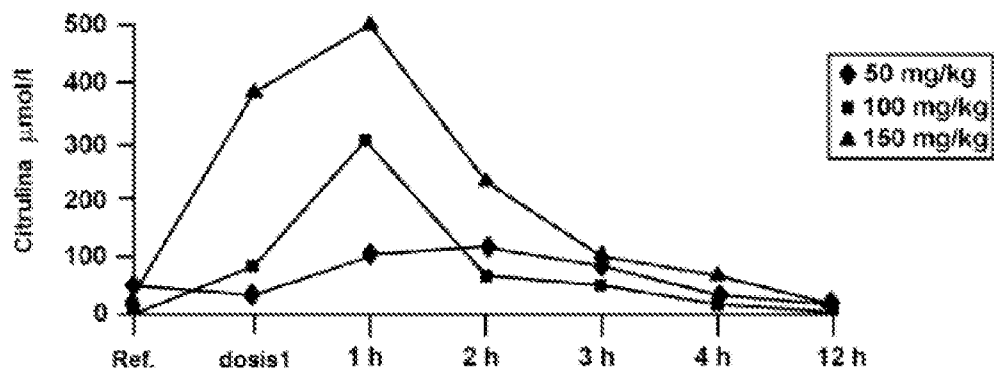


FIG. 12

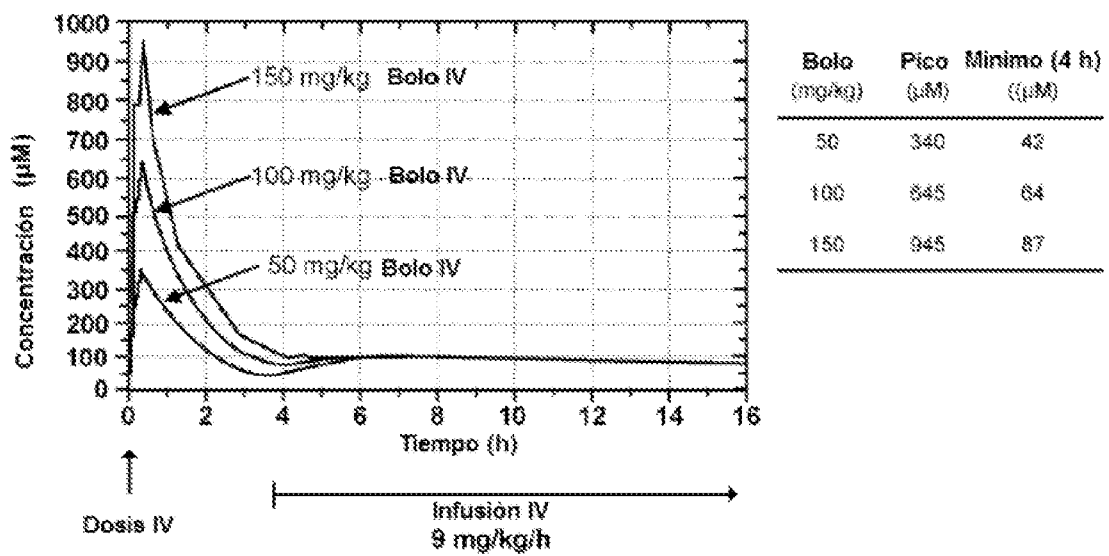


FIG. 13

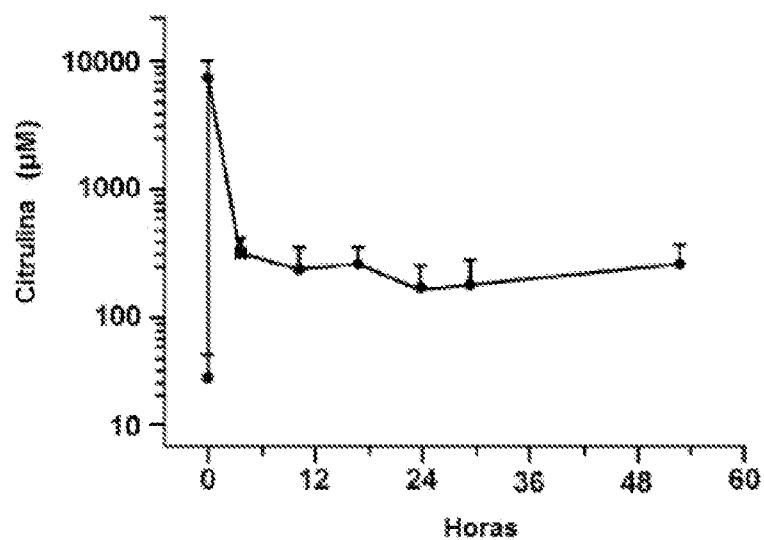


Figura 14A

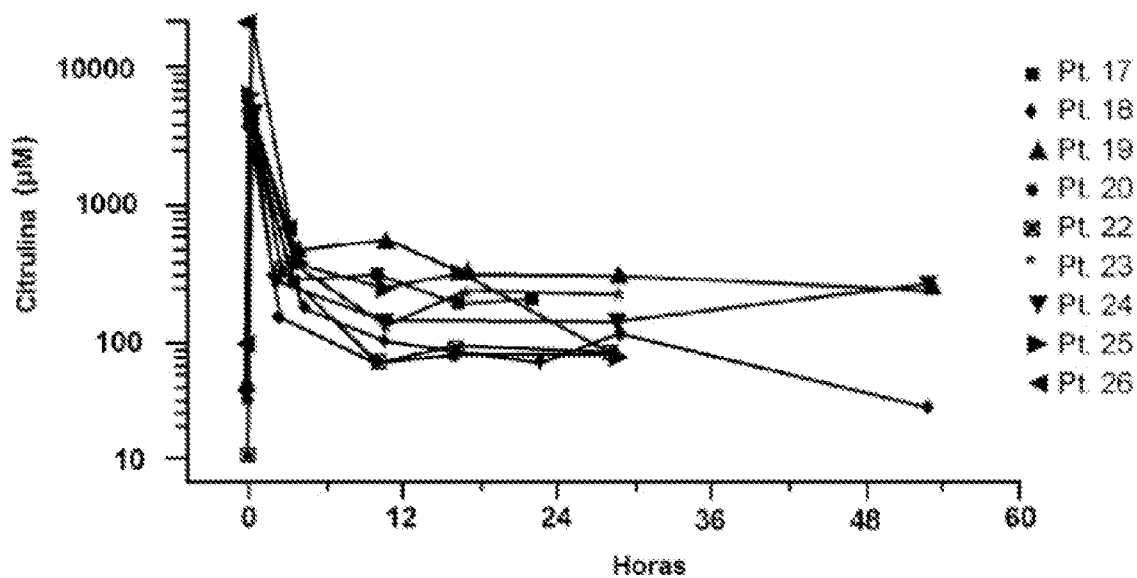


Figura 14B

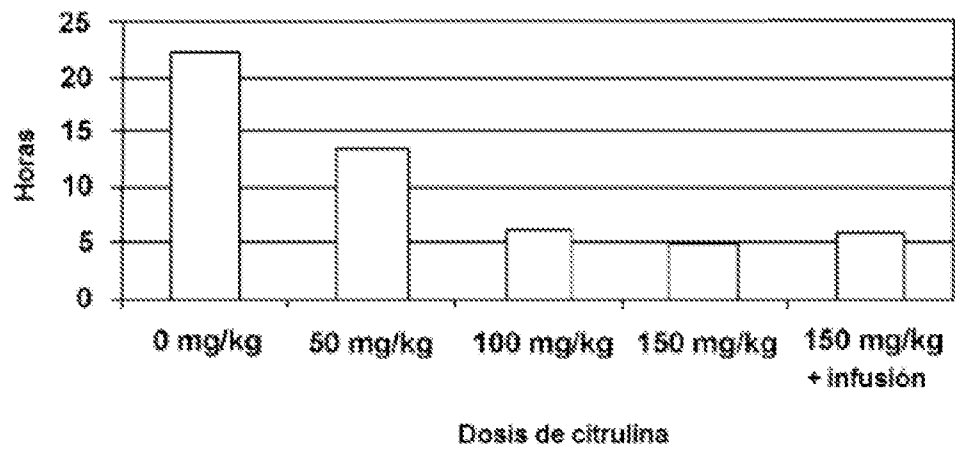


Figura 15

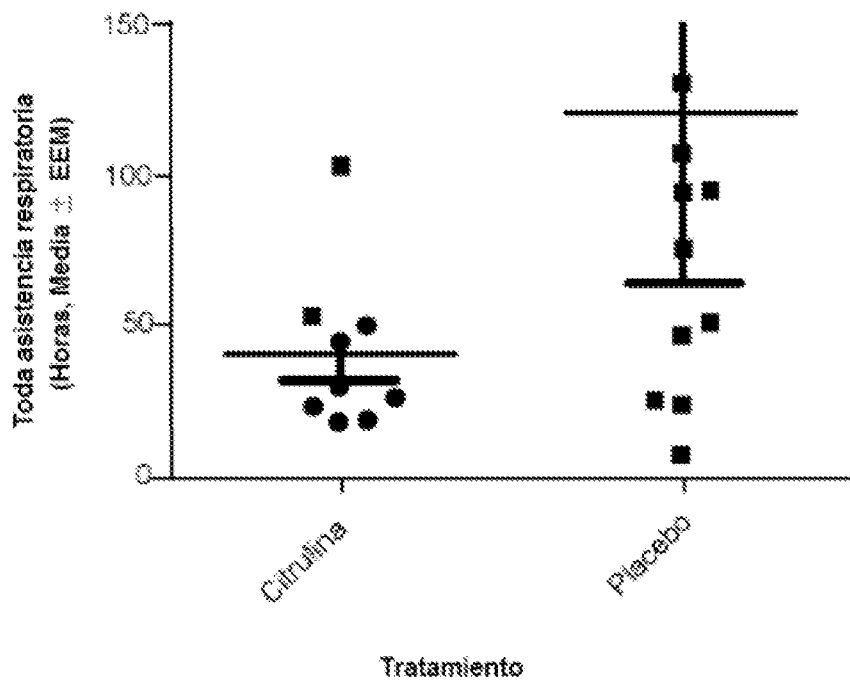


Figura 16

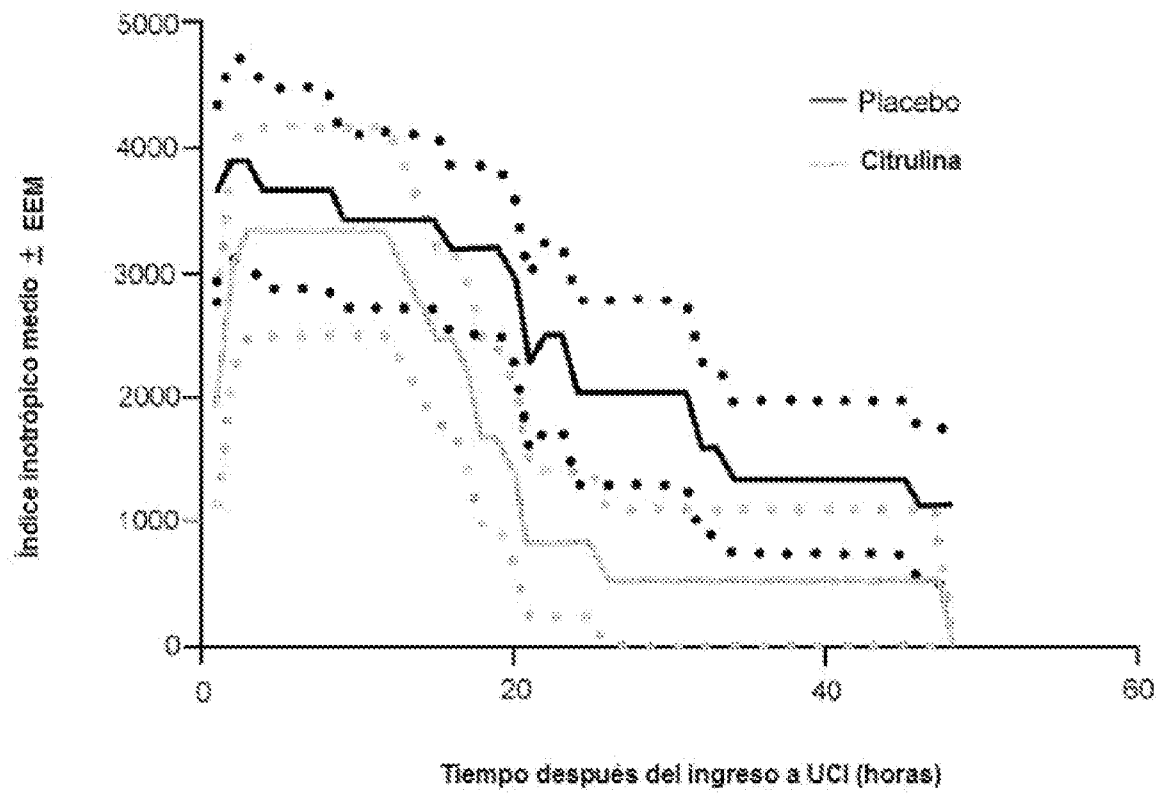


Figura 17

Figura 18A

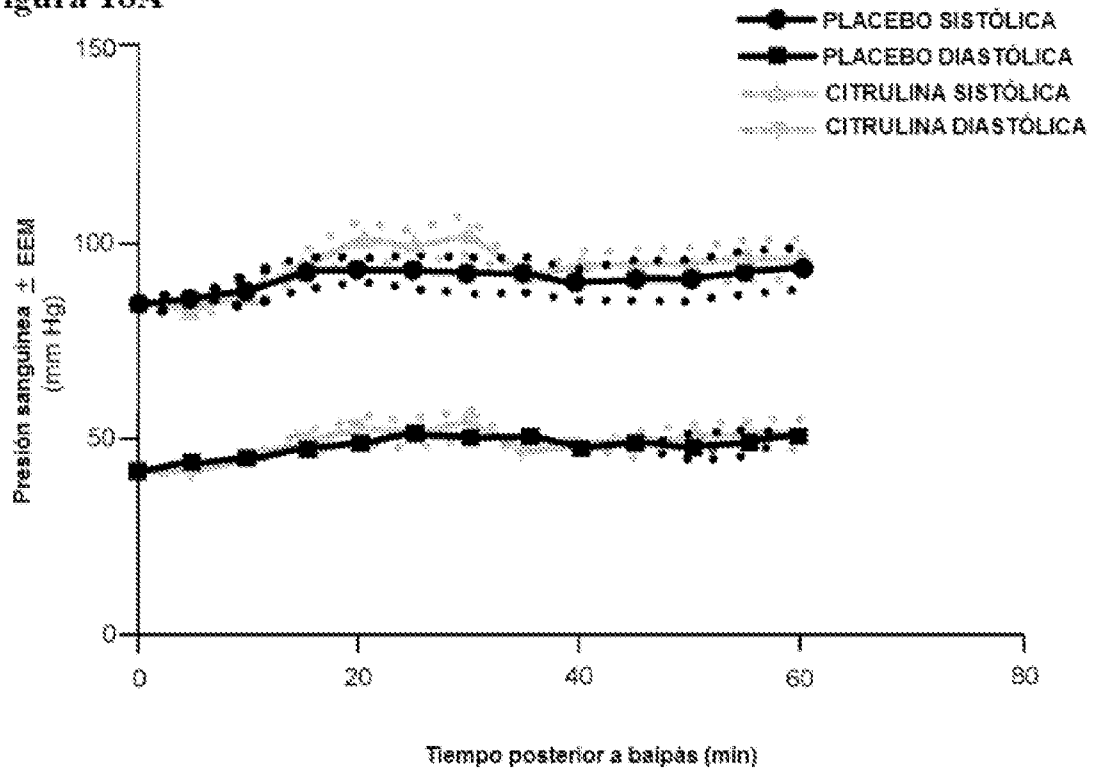
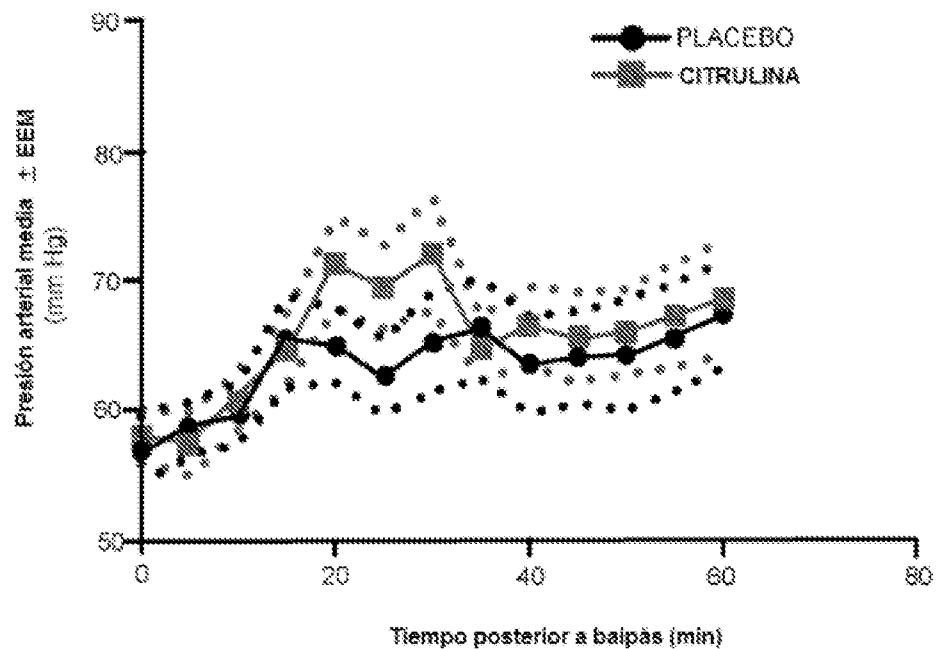


Figura 18B



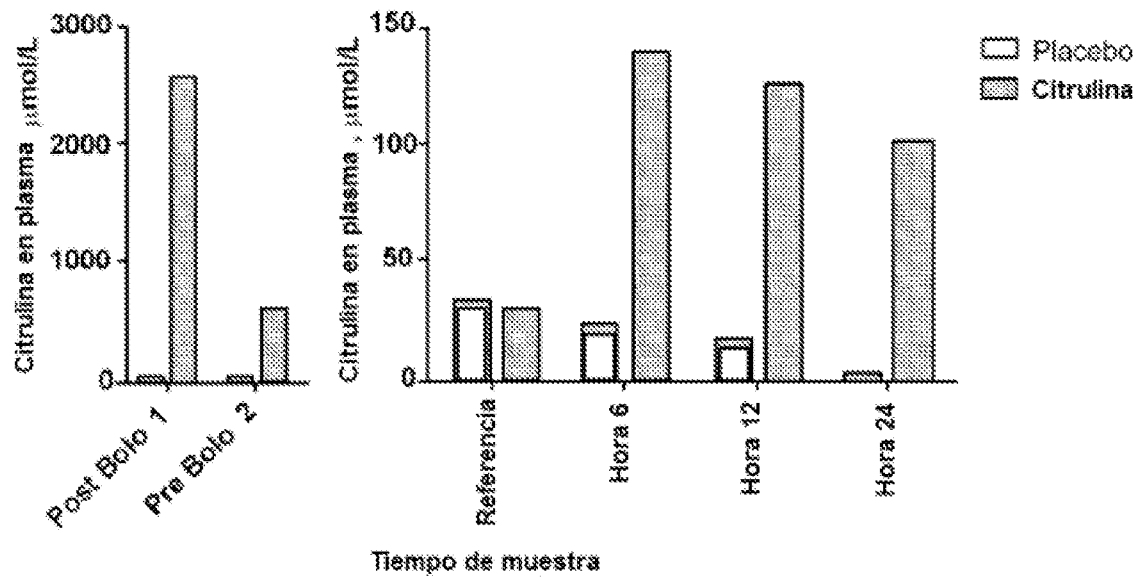


Figura 19

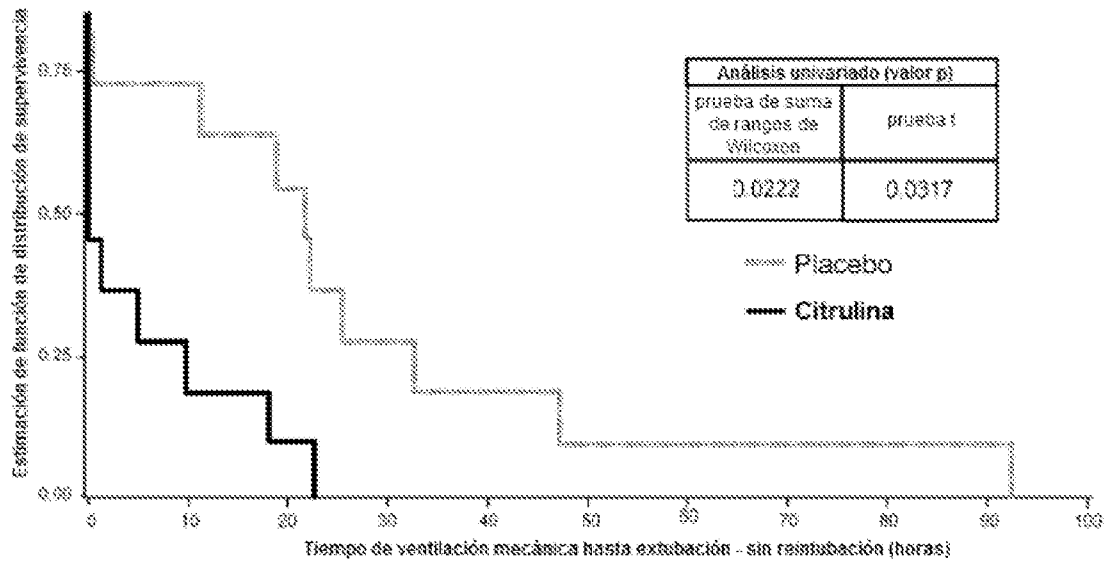


Figura 20

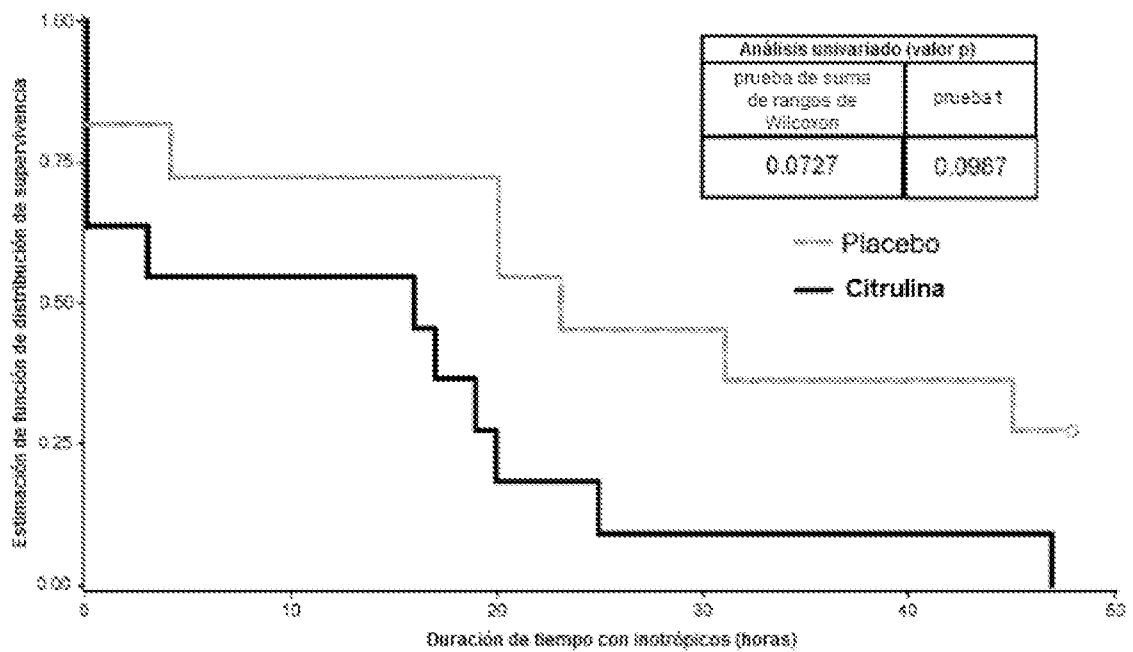


Figura 21

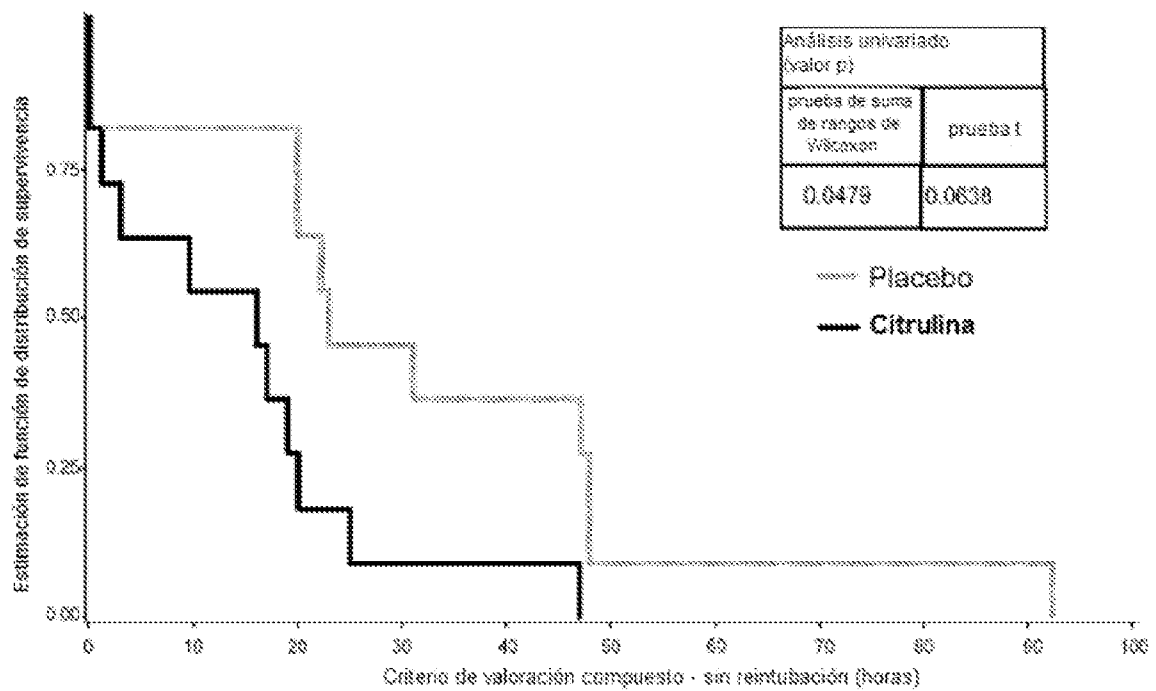
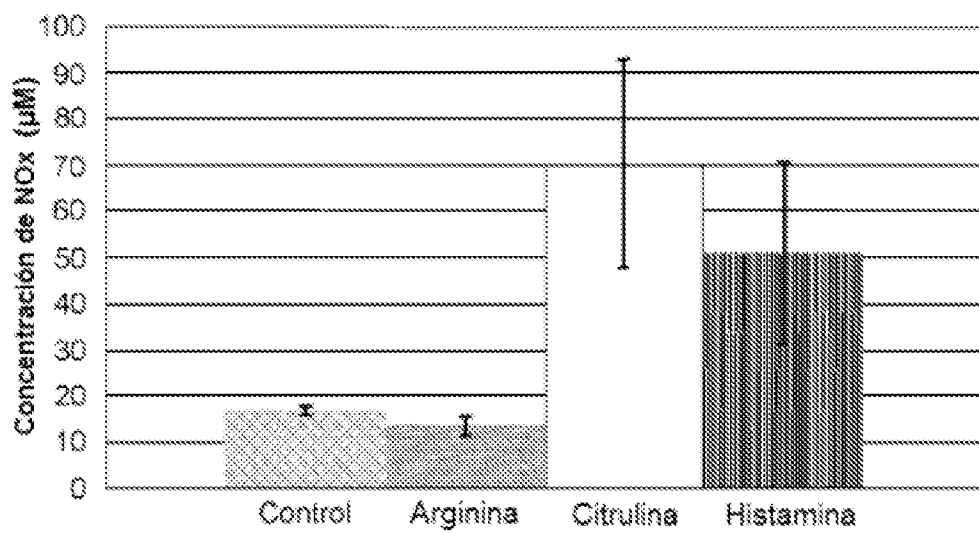


Figura 22



Agente administrado a células vasculares endoteliales humanas

Figura 23

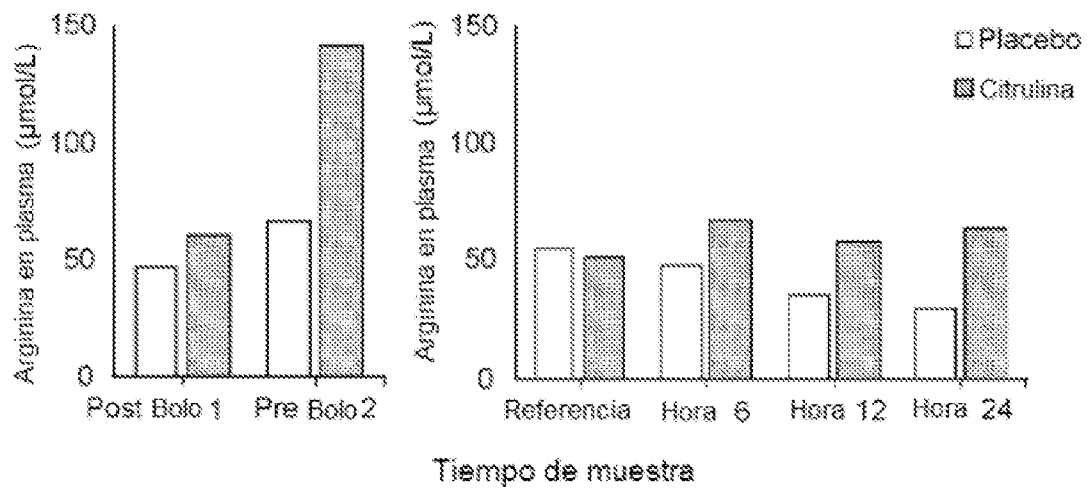


Figura 24A

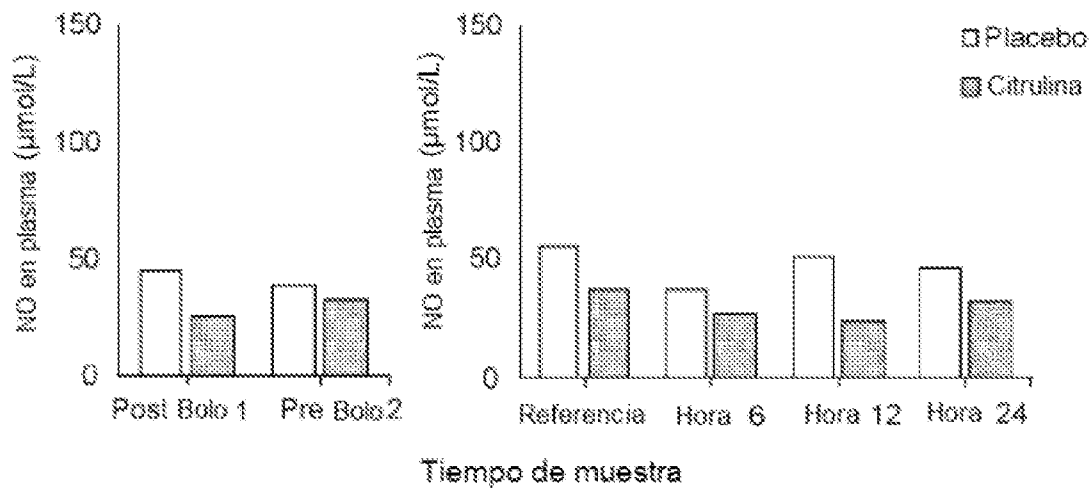


Figura 24B

Figura 25A

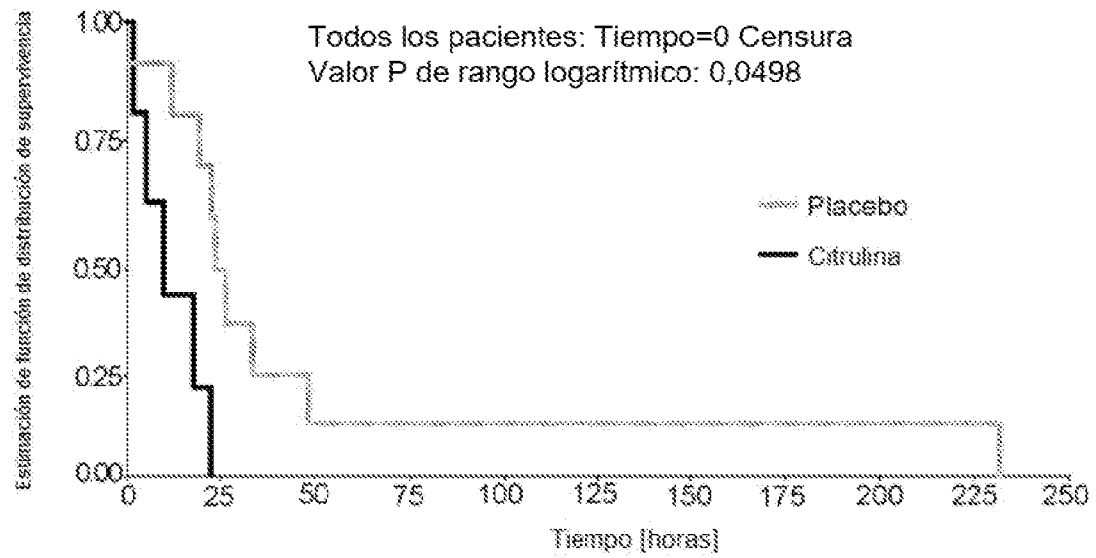


Figura 25B

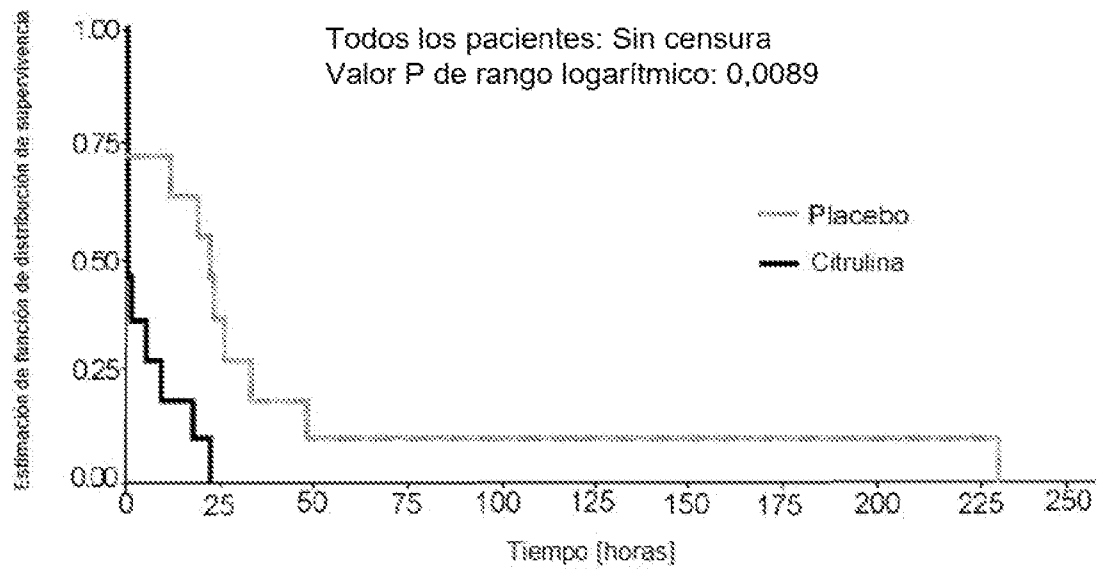


Figura 26A

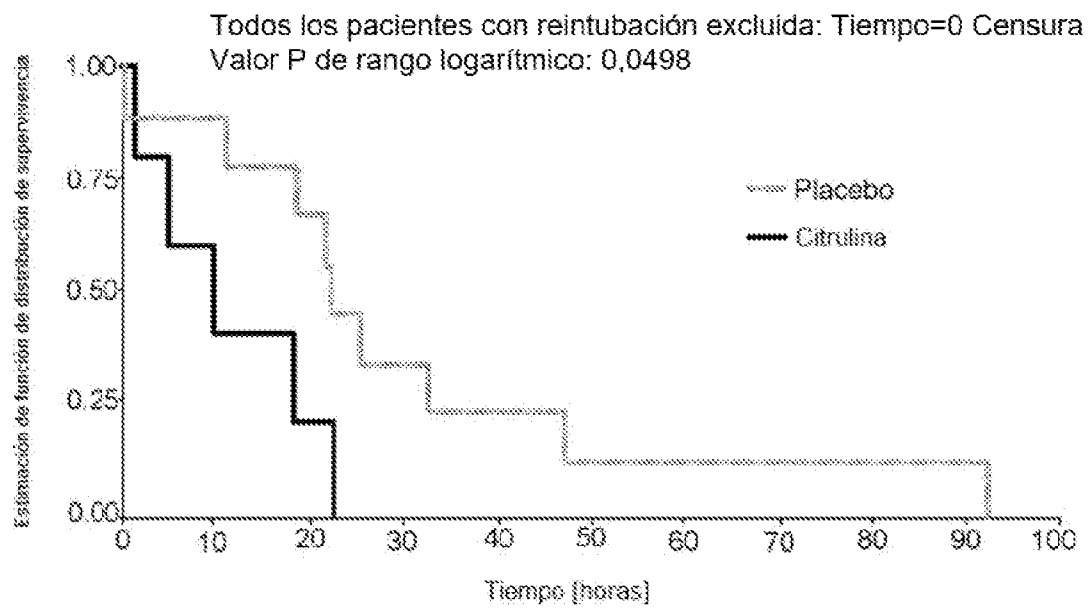


Figura 26B

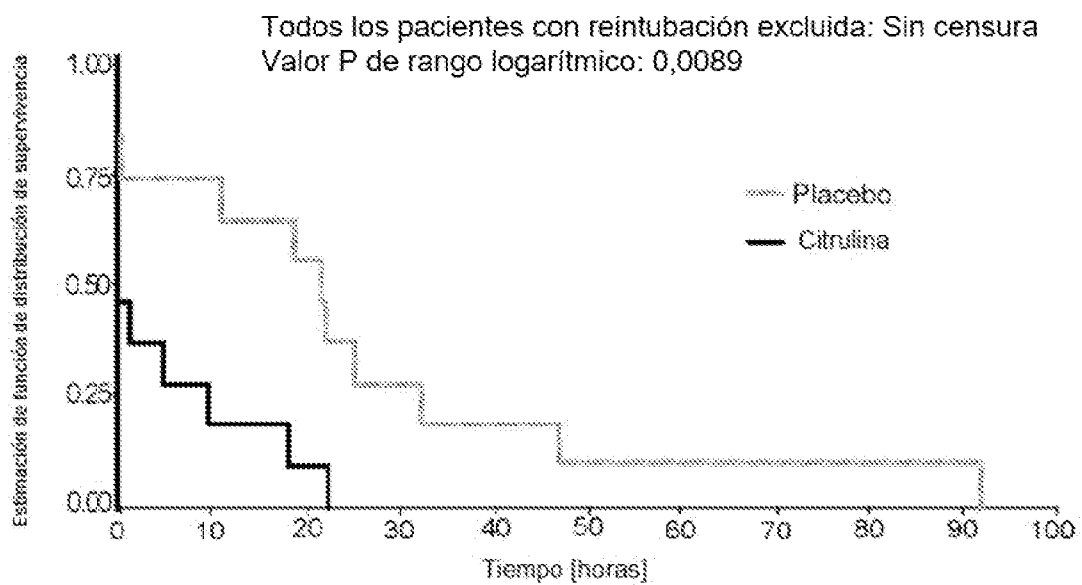


Figura 27A

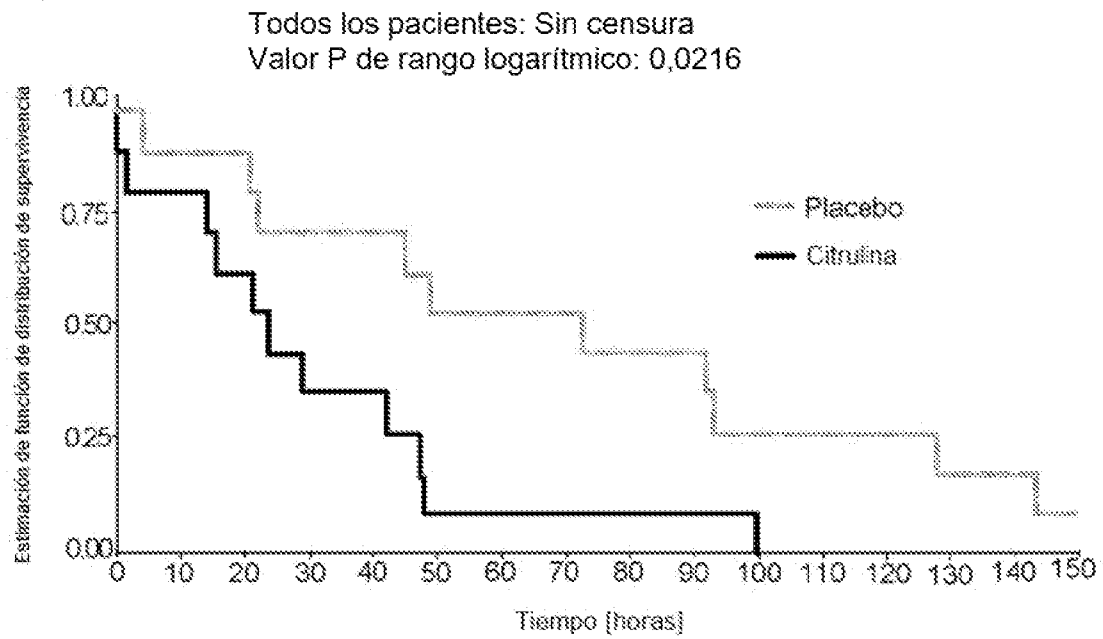


Figura 27B

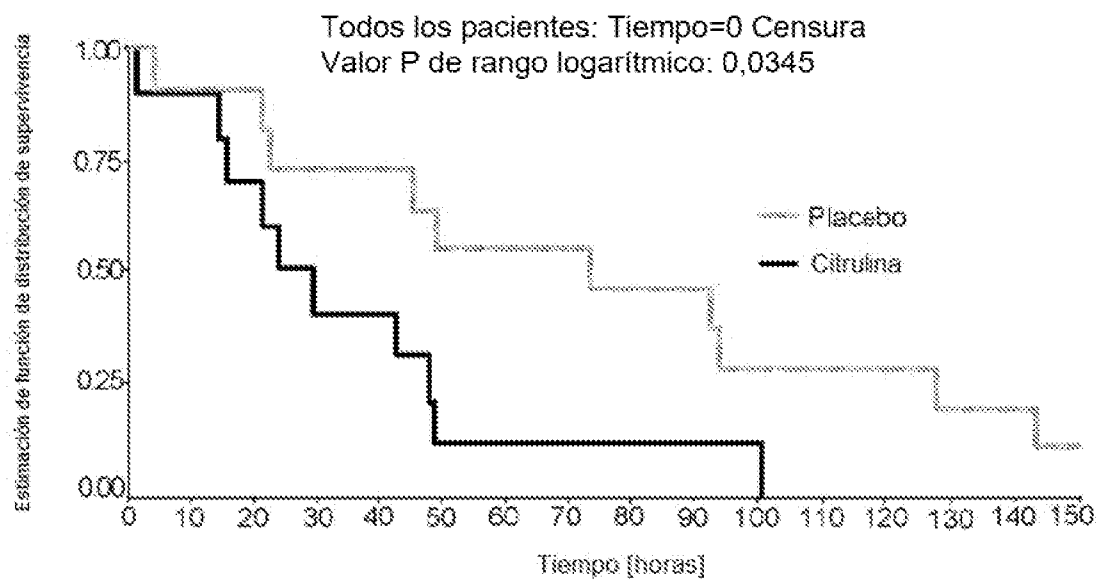
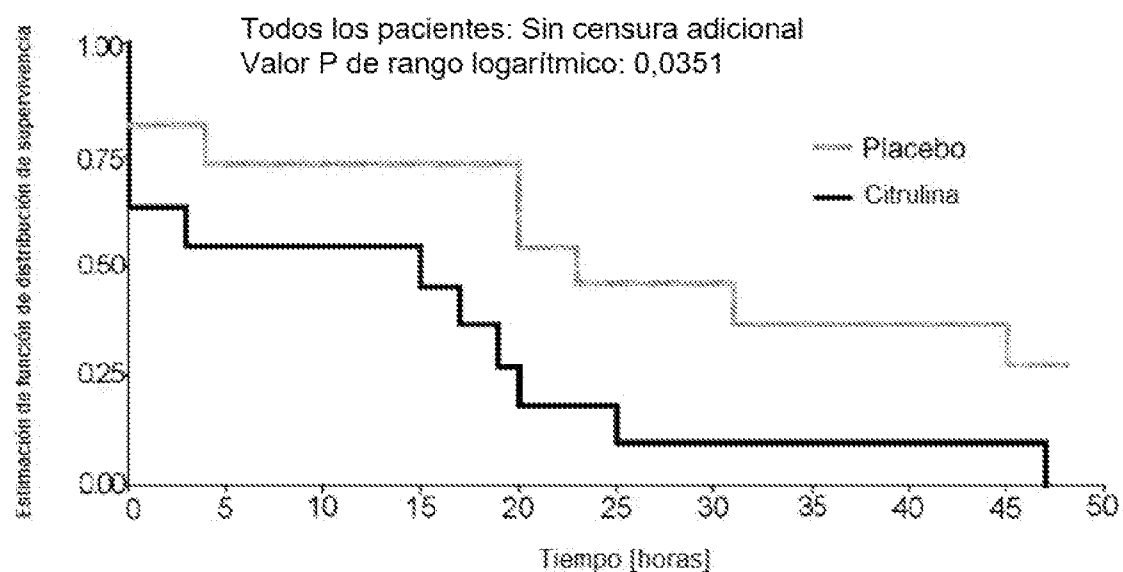
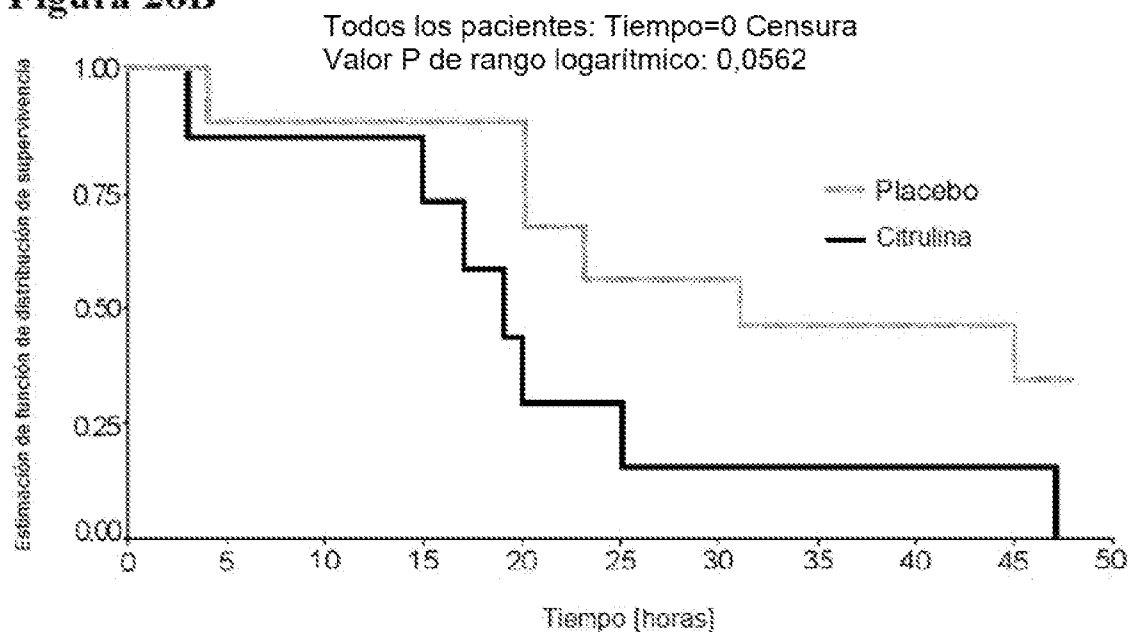


Figura 28A

Nota: Tiempo con inotrópicos se censura a las 48 horas si el paciente todavía estaba recibiendo inotrópicos en la hora 48.

Figura 28B

Nota: Tiempo con inotrópicos se censura a las 48 horas si el paciente todavía estaba recibiendo inotrópicos en la hora 48.

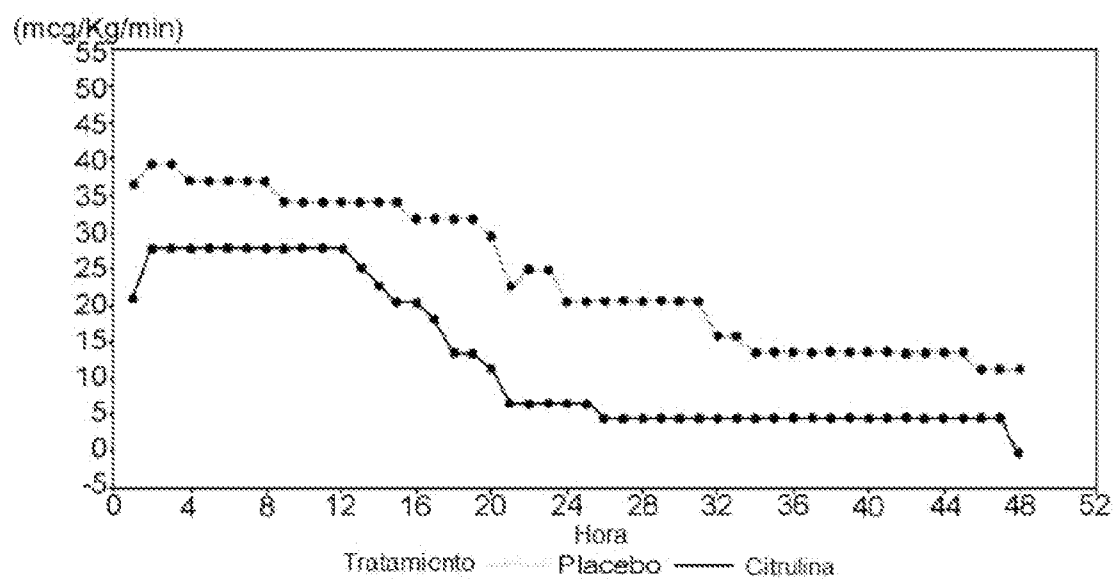
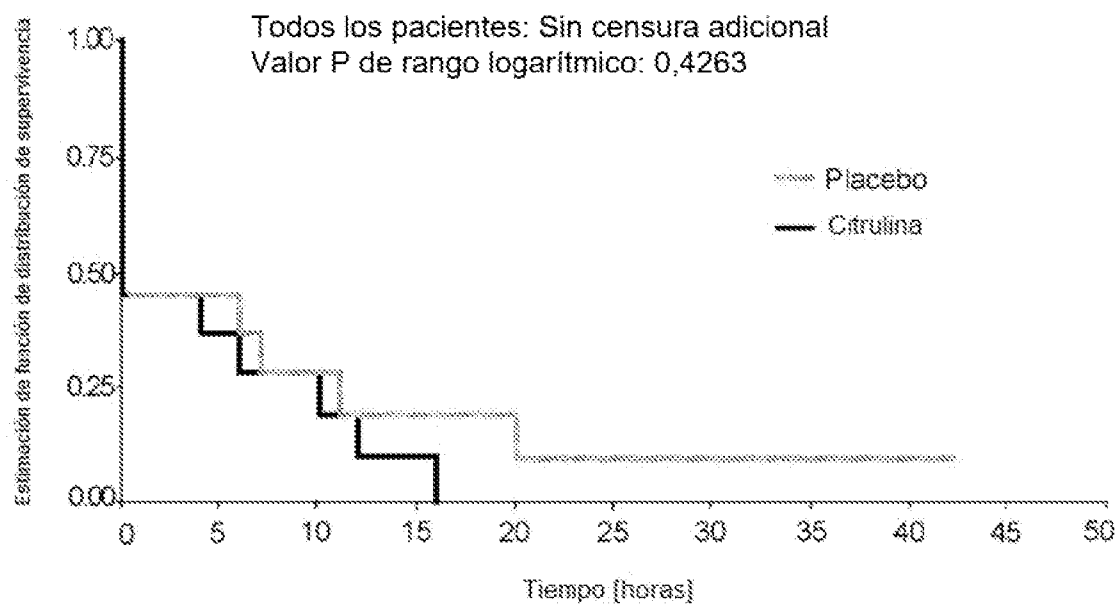
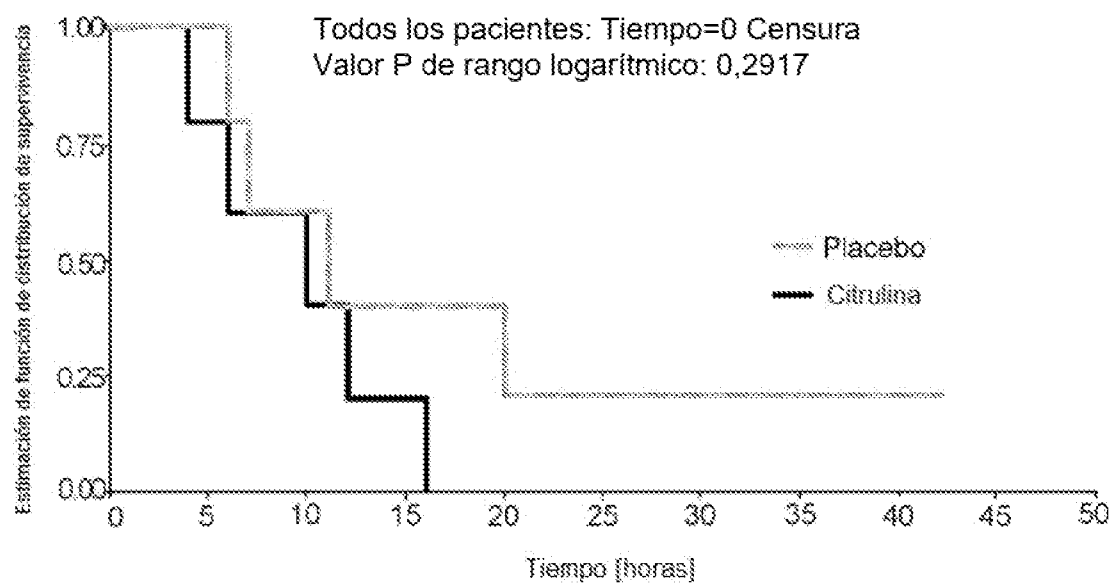


Figura 29

Figura 30A**Figura 30B**

Nota: Tiempo con medicamentos vasoactivos se censura a las 48 horas si el paciente todavía estaba recibiendo medicamentos vasoactivos en la hora 48.

Nota: Tiempo con medicamentos vasoactivos se censuró a las 48 horas si un paciente todavía estaba recibiendo medicamentos vasoactivos en este punto temporal.

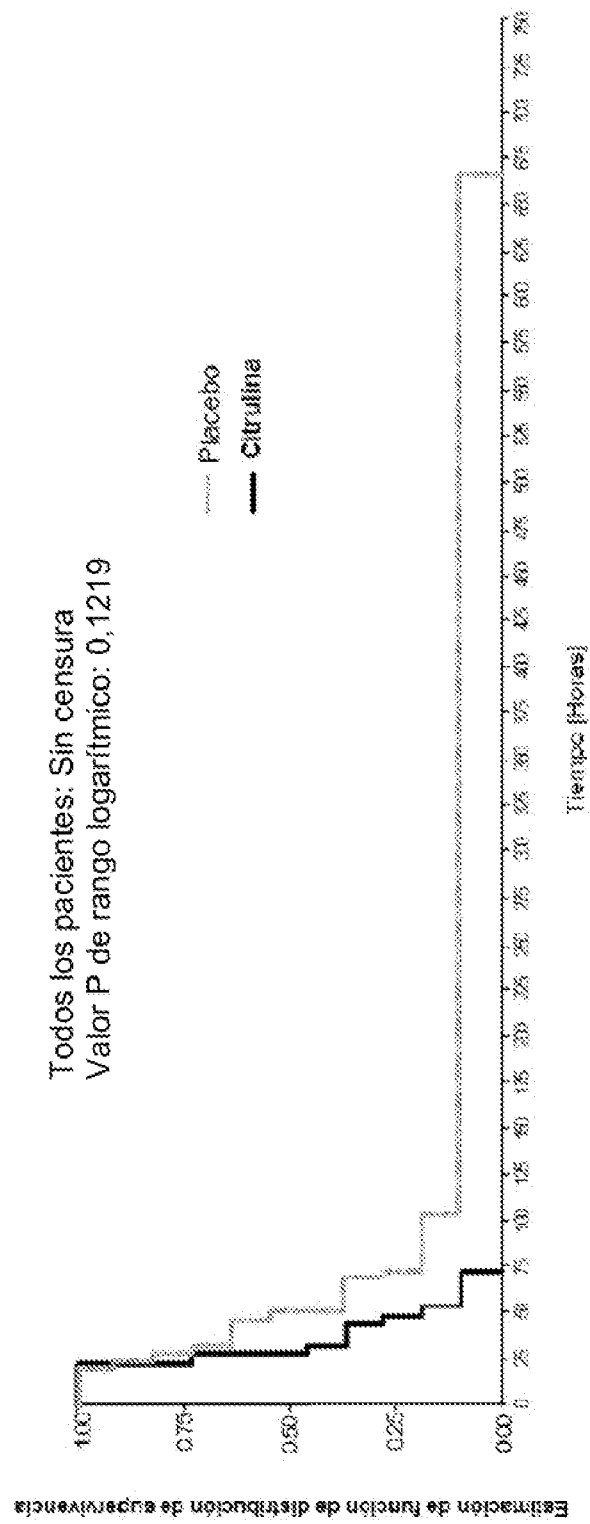


Figura 31

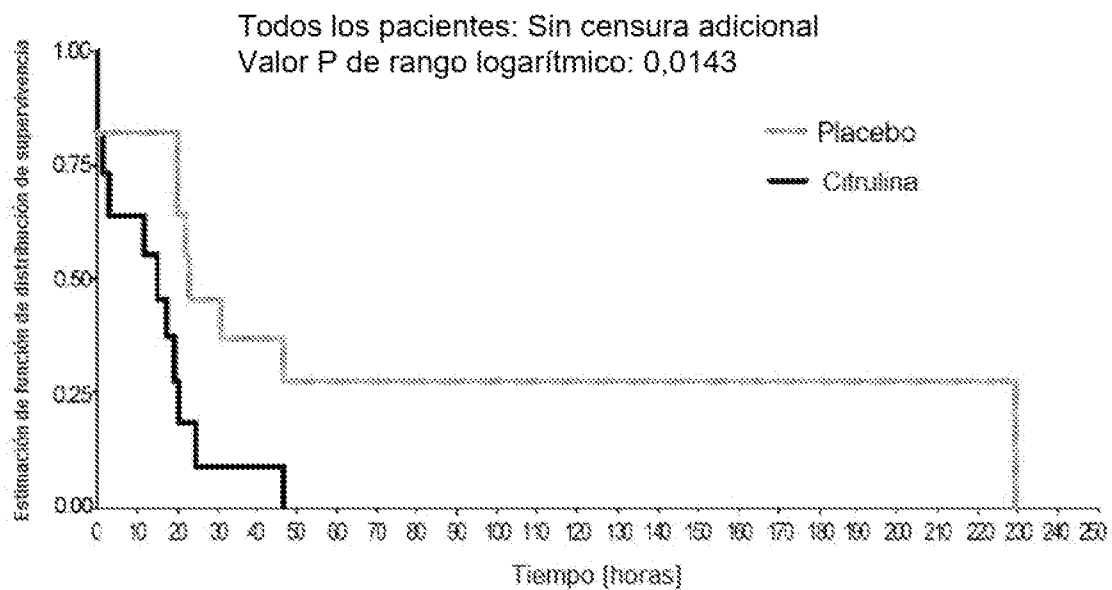
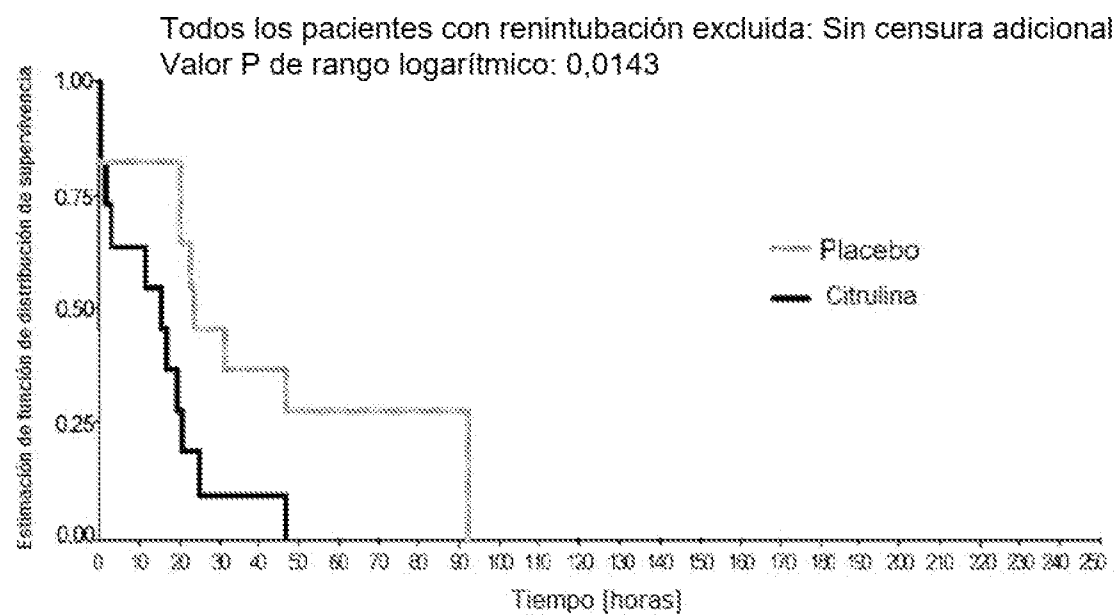


Figura 32A



Nota: La duración más larga se censuró si la duración de uso de vasodilatador o inotrópicos fue 48 horas.

Figura 32B

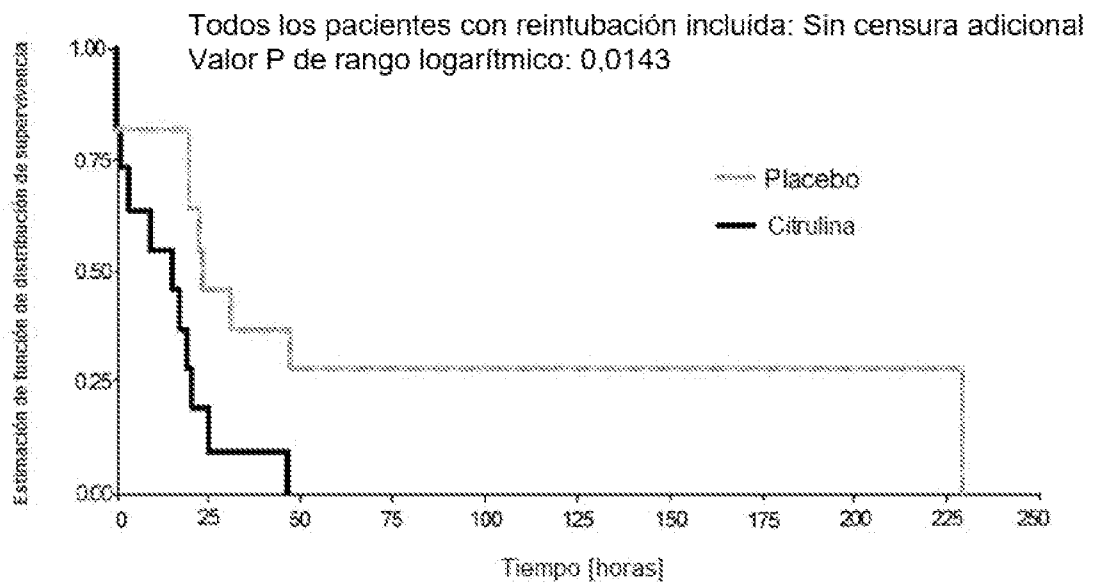


Figura 33A

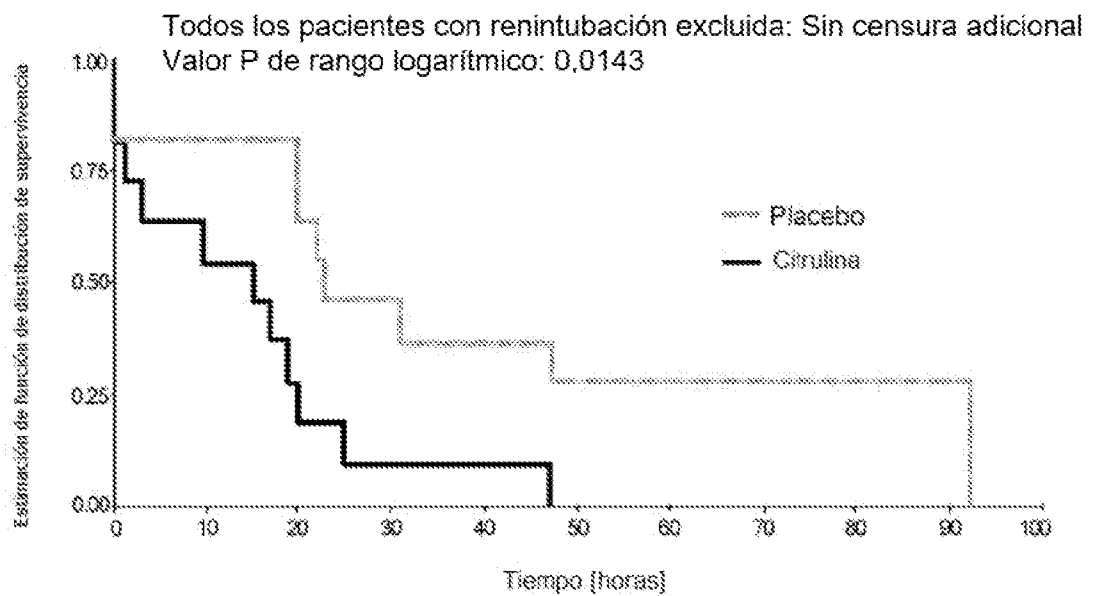


Figura 33B