

MONOGRAFÍAS DR. ANTONIO ESTEVE

LA INVESTIGACIÓN EN UN
ENTORNO ASISTENCIAL
ALGUNAS REFLEXIONES Y EJEMPLOS

S. Videla y F. Bosch

32

MONOGRAFÍAS DR. ANTONIO ESTEVE

LA INVESTIGACIÓN EN UN
ENTORNO ASISTENCIAL
ALGUNAS REFLEXIONES Y EJEMPLOS

S. Videla y F. Bosch

© 2005, Fundació Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera 2. E-08032 Barcelona
Teléfono: 93 433 53 20; fax: 93 450 48 99

Dirección Correo electrónico: fundacion@esteve.org
Dirección URL: <http://www.esteve.org>

Depósito legal: B-16.120-2005
ISBN: 84-7592-735-1
Coordinación y producción:
Scientific Communication Management, S.L.
Travesera de Gracia, 17-21. E-08021 Barcelona
Impreso en España por
Printed in Spain

La Fundación Dr. Antonio Esteve contempla como objetivo prioritario el estímulo del progreso de la terapéutica por medio de la comunicación y la discusión científica.

La Fundación quiere promover la cooperación internacional en la investigación farmacoterapéutica y, a tal fin, organiza reuniones internacionales multidisciplinarias donde grupos reducidos de investigadores discuten los resultados de sus trabajos. Estas discusiones se recogen en las publicaciones de los Esteve Foundation Symposia.

Otras actividades de la Fundación Dr. Antonio Esteve incluyen la organización de reuniones dedicadas a la discusión de problemas de alcance más local y publicadas en el formato de la presente monografía. La Fundación participa también en conferencias, seminarios, cursos y otras formas de apoyo a las ciencias médicas, farmacéuticas y biológicas y, con carácter bienal, concede un premio al mejor artículo publicado por un autor español dentro del área de la farmacoterapia.

*Entre otras publicaciones cabe destacar la serie *Pharmacotherapy Revisited: An Esteve Foundation Series*, en la cual a través de diferentes volúmenes se recopilan, en edición facsímil, los principales artículos que sentaron las bases de una determinada disciplina. Más recientemente, se ha iniciado la publicación de los Cuadernos de la Fundación Dr. Antonio Esteve.*

Tanto la introducción como los artículos y discusiones de la presente monografía recogen la opinión de los correspondientes autores, por lo que la Fundación Dr. Antonio Esteve no se hace necesariamente partícipe de su contenido. Los diferentes capítulos corresponden a las ponencias presentadas en la mesa redonda organizada por la Fundación Dr. Antonio Esteve en Bellaterra (Barcelona) el día 1 de junio de 2004, moderada por Sebastián Videla y Félix Bosch.

AGRADECIMIENTOS

La Fundación Dr. Antonio Esteve desea expresar su agradecimiento a Marcel Brosa por el diseño del programa *System Chair* y su adaptación técnica para la gestión informática de la moderación de las mesas redondas que dan lugar a la edición de estas monografías, así como a Pere Gavaldà por su contribución en las distintas fases de dicho proceso y a Israel Places por su colaboración técnica en el sistema de proyección empleado durante la mesa redonda.

La investigación en un entorno asistencial

Algunas reflexiones y ejemplos

S. VIDELA Y F. BOSCH	
Introducción	IX
J.R. MORANDEIRA	
Investigación y cirugía experimental como base formativa para una medicina de excelencia	1
E. QUINTERO CARRIÓN	
Investigación en gastroenterología en el contexto actual de la medicina	7
F.J.C. SORIGUER ESCOFET	
¿Es la clínica una ciencia? Punto de vista de un endocrinólogo	13
J.C. PASTOR JIMENO	
Investigación básica en oftalmología	23
D. GARCÍA-OLMO Y D.C. GARCÍA-OLMO	
Investigación en cáncer colorrectal: visión del cirujano	29
LL. BLANCH TORRA Y M. DALMASES	
Investigación en un entorno como la Corporació Parc Taulí	37

J.M. PIQUÉ BADIA	
Investigación básica-experimental en gastroenterología: ¿una actividad alejada de la práctica clínica?	43
A.I. SANCHEZ FRUCTUOSO	
Investigación básica en nefrología: plomo, hipertensión arterial y gota	49
D. GARCÍA-DORADO	
Papel de las mitocondrias en la necrosis miocárdica por isquemia-reperusión: un reto para la investigación cardiovascular	55
M. BARRIOS GARCÍA, J. ROMÁN GÓMEZ, A. JIMÉNEZ VELASCO, A. TORRES Y A.I. HEINIGER	
Investigación en hematología: metilación del ADN como factor pronóstico en pacientes con leucemia aguda linfoblástica	65
M.A. DE MAEZTU, J.I. ÁLAVA, I. BRACERAS Y C. GAY-ESCODA	
Mejora de la integración ósea de los implantes dentales, prótesis y placas de osteosíntesis mediante un nuevo tratamiento de superficie: implantación iónica	73

Relación de participantes

VICENTE ALFARO

Departamento de Investigación
PharmaMar S.A.
Parc Científic de Barcelona-Torre D.
Baldiri Reixac, 4-6
08028 Barcelona

YOLANDA ÁLVAREZ GARCÍA

Departament de Farmacologia
i Toxicologia
Hospital del Mar-IMIM
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona

FRANCISCO ARNALICH

Departamento de Oftalmología
Hospital Ramón y Cajal de Madrid
Ctra. de Colmenar Viejo, Km. 9,1
28034 Madrid

DANIEL BARDÁN

Servicio de Hematología
Hospital Regional Universitario
Carlos Haya
Avda. Carlos Haya, s/n
29010 Málaga

DIEGO BARRAL

Departament de Farmacologia
i Toxicologia
Hospital del Mar-IMIM
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona

MANUEL BARRIOS

Servicio de Hematología
Hospital Regional Universitario
Carlos Haya
Avda. Carlos Haya, s/n
29010 Málaga

LLUÍS BLANCH TORRA

Unidad de Cuidados Intensivos
Corporació Sanitària Parc Taulí
Parc Taulí, s/n
08208 Sabadell

FÉLIX BOSCH

Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera, 2
08032 Barcelona

MIGUEL A. DE MAEZTU

Lifenova Biomedical
Centro Tecnológico
Fundación INASMET
20400 Tolosa

SERGIO ERILL

Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera, 2
08032 Barcelona

JUAN FORTEA

Servei de Neurologia
Hospital Clínic i Provincial
de Barcelona
Villarroel, 170
08036 Barcelona

DAVID GARCÍA-DORADO

Servei de Cardiologia
Hospital General Universitari
Vall d'Hebron
Pg. Vall Hebron, 119-129
08035 Barcelona

DAMIÁN GARCÍA-OLMO

Departamento de Cirugía
Facultad de Medicina
Hospital Universitario La Paz
Módulo Bioquímica. Despacho B-24
Paseo de la Castellana, 261
28046 Madrid

DOLORES HERREROS

Cirugía General y del Aparato Digestivo
Hospital Universitario La Paz
Paseo de la Castellana, 261
28046 Madrid

JOAN JUAN

Ediciones Doyma, S.A.
Travesera de Gracia, 17-21
08021 Barcelona

JOSÉ RAMÓN MORANDEIRA

Servicio de Cirugía
Hospital Clínico Universitario
"Lozano Blesa"
Avda. San Juan Bosco, 15
50009 Zaragoza

SONSOLES MORCILLO

ESPINA

Servicio de Endocrinología
y Nutrición
Hospital Civil (Hospital Universitario
Carlos Haya)
Avda. del Hospital Civil, s/n
29009 Málaga

RICARDO PARDO

Departament de Farmacologia
i Toxicologia
Hospital del Mar-IMIM
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona

ISABEL PASCUAL

Cirugía General
y del Aparato Digestivo
Hospital Universitario La Paz
Paseo de la Castellana, 261
28046 Madrid

J. CARLOS PASTOR JIMENO

Instituto Universitario
de Oftalmobiología Aplicada (IOBA)
Universidad de Valladolid
Edificio de Ciencias de la Salud
Avda. Ramón y Cajal 7, 3ª planta
47005 Valladolid

JOSEP M.^a PIQUÉ BADÍA

Servei de Gastroenterologia
Hospital Clínic i Provincial
de Barcelona
Villarroel, 170
08036 Barcelona

ENRIQUE QUINTERO CARRIÓN

Servicio de Gastroenterología
Hospital Universitario de Canarias
Ofra, s/n
38320 La Laguna

ANA ISABEL SÁNCHEZ FRUCTUOSO

Departamento de Nefrología
Hospital Clínico Universitario
San Carlos
Avda. Dr. Martín Lagos, s/n
28040 Madrid

FEDERICO J.C. SORIGUER ESCOFET

Servicio de Endocrinología y Nutrición
Hospital Civil (Hospital Universitario
Carlos Haya)
Avda. del Hospital Civil, s/n
29009 Málaga

SEBASTIÁN VIDELA

Servicio de Enfermedades Digestivas
Fundació Institut de Recerca
Hospital General Universitari
Vall d'Hebron
Pg. Vall Hebron, 119-129
08035 Barcelona

Introducción

Probablemente son muchos y de muy diversa índole los factores que condicionan que en la actualidad la investigación, sea básica o aplicada, presente grandes limitaciones para desarrollarse en los centros asistenciales españoles. A pesar de ello, y desgraciadamente de forma aún muy aislada, existen grupos punteros en investigación en determinados hospitales. Con todo, en estos grupos suele ser difícil hallar médicos que, como parte de su labor profesional, compaginen la investigación con la asistencia clínica.

Sin pretender ser exhaustivos, entre los factores que podrían explicar la falta de investigación desde determinados ámbitos médicos, cabría destacar la falta de una tradición histórica en investigación que arrastra nuestro país, además de una insuficiente inversión en lo que ahora se denomina investigación, desarrollo e innovación (I+D+I). Mientras que en España actualmente este concepto justo alcanza el 1% del PIB, la inversión en I+D+I de Europa se cifra como media en un 2,7%. Además, concretamente en España y para agravar la situación, una tercera parte de esta inversión se atribuye a investigación militar. Es preciso recordar, también, que la solución a dicho problema implica un esfuerzo tanto para el sector público como para el privado.

A la falta de recursos podrían añadirse otros factores, como la necesidad de potenciar la formación investigadora y el desarrollo profesional de los investigadores. Sin duda es recomendable potenciar la formación en investigación dentro del currículum de algunas licenciaturas en ciencias de la salud y favorecer que los médicos residentes puedan adquirir no sólo experiencia asistencial sino también conocimientos y habilidades en investigación. Por otra parte, muchos investigadores españoles ejercen en el extranjero como consecuencia de un casi inexistente marco para integrarlos en centros de investigación españoles tanto públicos como privados.

A pesar de dichas limitaciones, en los últimos años se han consolidado iniciativas que intentan agrupar equipos multidisciplinares de investigadores y redes de colaboración para aunar esfuerzos y compartir experiencia y recursos. Si

bien creemos que estas iniciativas pluridisciplinares deberían ser realmente fructíferas, desde aquí intentamos defender el papel del médico asistencial y a la vez investigador. Es decir, aquel profesional que atiende y trata pacientes y que, simultáneamente, desarrolla una actividad investigadora, ya sea básica o aplicada. Esta doble vertiente puede facilitar tanto el orientar la investigación a las necesidades del paciente, como el resolver incógnitas que se plantean desde la propia asistencia clínica diaria.

Los contenidos de esta monografía reflejan las presentaciones y discusiones de la mesa redonda organizada por la Fundación Dr. Antonio Esteve el mes de junio de 2004 en Barcelona. Su objetivo fue concienciar a los que se inician en la práctica asistencial de que labor clínica e investigación no son incompatibles. Esta iniciativa deriva de una experiencia previa surgida hace ya unos años que dio lugar a la publicación de una Monografía Dr. Antonio Esteve anterior*. Se invitaron a médicos investigadores de varias áreas terapéuticas y de diferente procedencia geográfica, cuya característica común era la compaginación de la actividad investigadora con la asistencia clínica. Del mismo modo que en 1987, ahora de nuevo invitamos como discutidores a diversos médicos jóvenes con el fin de estimular su interés por la investigación. Esperemos que la amplia distribución de la presente monografía contribuya también a ello.

Los moderadores quedamos convencidos de que fue una reunión muy interesante y fructífera. Si bien inicialmente el encuentro se tituló "Investigación básica y medicina clínica", a semejanza de la mesa redonda previa, después de la realización de ésta y con los manuscritos de los ponentes en nuestras manos, decidimos que podría ser más adecuado hablar de "La investigación en un entorno asistencial. Algunas reflexiones y

*Erill S, Castell JV. Investigación básica y medicina clínica. Monografías Dr. Antonio Esteve, nº 7. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve; 1988.

ejemplos". También decidimos que podía ser más práctico reordenar las presentaciones en esta monografía; en primer lugar, incluimos aquellas ponencias que principalmente discutieron la problemática de la investigación desde una perspectiva amplia –los tres primeros artículos– y, posteriormente, las experiencias de un proyecto más concreto de investigación como ejemplo de investigación en un entorno asistencial.

Si "serendipidad" (*serendipity*) se define como la sagacidad por descubrir cosas que ocurren o se producen sin buscarlas, esperamos que esta publicación al menos estimule la "serendipidad" entre los jóvenes profesionales sanitarios al convencerles del interés que supone el potenciar la investigación desde un marco asistencial.

Sebastián Videla y Félix Bosch

Investigación y cirugía experimental como base formativa para una medicina de excelencia

J.R. Morandeira

Unidad Mixta de Investigación, Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa", Universidad de Zaragoza.

Introducción

No es el objetivo de este trabajo explicar por menorizadamente los objetivos, prestaciones, estructuración y funcionamiento de una unidad de investigación (UI) del Servicio Nacional de Salud (SNS). Remitimos a quienes estén interesados en el tema a otras publicaciones específicamente realizadas al respecto por nuestro grupo, con especial mención a los antecedentes, constitución y funcionamiento actual de la Unidad Mixta de Investigación del Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" y la Universidad de Zaragoza, como UI integrada en el SNS.

Lo que aquí pretendemos es centrar el papel de estas UI en el moderno concepto del hospital como centro de investigación, ya que, según afirmaba recientemente A. Campos, Director del Instituto de Salud Carlos III: "El hospital que no investiga no es un hospital. Puede ser una clínica, un ambulatorio, etc., pero no un verdadero hospital, ya que lo que debe caracterizar a un hospital es su capacidad de facilitar el clima científico necesario para hacer realidad que el hecho investigador sea consustancial a la actividad asistencial y docente de todos y cada uno de los profesionales de la salud".

Es evidente que en España partimos de una herencia nefasta en el campo de la investigación, marcada por algunas frases pronunciadas por los máximos responsables de nuestro país hace escasamente 30 años: del "que investiguen ellos..." al "menos latin y más fútbol". Esta situación fue, además, especialmente marcada en el campo de la sanidad por la creación de una estructura exclusivamente asistencial que negaba la actividad investigadora. En este sentido, los pasos seguidos desde la creación del seguro obligatorio de enfermedad (SOE) como mera compañía aseguradora hasta el actual SNS, pasando por la Seguridad Social (SS), que ha ido dotando al sistema de estructuras asistenciales propias, potenciando por fin en los últimos 10 años el I+D+I en salud y

la investigación en ciencias biomédicas, es una larga, demostrativa y aún inacabada historia.

No vamos a caer en el error de comparar nuestra investigación y formación médica con la norteamericana o la alemana, porque las diferencias estructurales, económicas y de todo tipo hacen que la comparación sea, todavía hoy día, inviable. Pero tampoco vamos a caer en el pesimismo y el desánimo. Es cierto que aún queda mucho por hacer, porque partimos de un nivel muy bajo, pero nadie puede negar el gran esfuerzo realizado en nuestro país en los últimos 15 años. Y quienes podemos comparar las unidades de investigación que hoy tenemos y sus secciones experimentales con los "laboratorios de cirugía experimental" que teníamos hace 20 o 30 años podemos constatarlo. Por eso, creo que no debemos desperdiciar el esfuerzo organizativo que han puesto en marcha en España los servicios universitarios de apoyo a la investigación y las unidades de investigación del SNS, cuya creación y desarrollo se inició a partir de 1987. Todas las partes implicadas en la puesta a punto y desarrollo de estos planes y estructuras (autoridades universitarias y sanitarias, instituciones científicas, gerencias hospitalarias y personal adscrito a las unidades) debemos trabajar sin escatimar ningún esfuerzo para su paulatina difusión e implantación, y su ordenado y eficaz funcionamiento. Es un gran reto al que nos enfrentamos y al que estamos obligados a responder sin escatimar tiempo, recursos, imaginación ni voluntad de entendimiento. Se trata, en definitiva, de un compromiso ético.

De la necesidad de investigar a la posibilidad de hacerlo

Resulta evidente la preocupación casi obsesiva de la sociedad actual por minimizar el error, ese riesgo inherente a toda actividad humana y al que el médico, ya totalmente desmitificado mer-

ced a la realidad científica de la medicina, no es ajeno. Pero minimizar el error es tarea ardua en medicina, sobre todo si se tiene en cuenta la frase con que hace algo más de 50 años Sir William Osler solía terminar la exposición de su última clase del curso a los estudiantes de medicina de Oxford: "la mitad de lo que se les ha enseñado no es cierto; el problema es que no sabemos cuál es esa mitad".

De ahí la necesidad de una buena formación básica en la que puedan permitirse los errores para aprender a corregirlos. Como es lógico, este tipo de formación sólo es posible en el contexto del campo del I+D+I. Además, tiene la ventaja de poder proporcionar simultáneamente al médico un cierto entrenamiento en investigación, de gran utilidad para protegerle del error, ya que es evidente que el médico que ha aprendido a observar minuciosamente y desapasionadamente, a razonar rigurosamente sobre los hechos, a concluir con cautela, y a admitir que toda conclusión es una parte tan sólo de la verdad y en sí misma criticable, minimizará su margen de error mucho más que aquel que carezca de estas cualidades a las que enseña y fomenta la actividad de investigar.

En 1989, Calnam se preguntaba: "si son tan numerosos los temas que requieren ser investigados, ¿cómo es que no todo el mundo está investigando?". A lo que seguramente alguien le contestaría lo de casi siempre: la investigación, y más aún la experimentación animal, es cara. Requiere cuantiosas inversiones en infraestructura, en personal, en equipamiento, etc. Estamos en un momento de recesión económica. No hay financiación. La presión asistencial no nos deja tiempo para investigar.

Sin embargo, es claro que sólo el progreso tecnológico lleva a la simplificación y el abaratamiento; que sólo el ingenio del hombre ha conseguido dominar, a la larga, las condiciones adversas, incluidas las económicas; que, como decía D. Santiago Ramón y Cajal: "no hay cuestiones agotadas, sino hombres agotados en las cuestiones". De ahí, la necesidad de estimular a los médicos a dedicar siquiera una parcela de su tiempo a la investigación durante toda su carrera profesional. A preguntarse cada día si su trabajo es el correcto, aunque sólo sea para que no le digan un día que lleva 40 años cometiendo el mismo error y a eso lo llama experiencia.

Desgraciadamente, la formación que se adquiere en las facultades de medicina no incluye el aprendizaje del método científico, y la educación médica tradicional tiende a transformarnos en recipiendarios pasivos de información, algo

que se ha visto enormemente incrementado en los últimos tiempos con el gran desarrollo de las nuevas tecnologías informáticas. Además, la estructura funcional de nuestros sistemas universitario y sanitario aborta las iniciativas y el estímulo. Pero entiendo que no debemos quedarnos quietos; al fin y al cabo, todo eso puede ser vencido si se sabe aprovechar el impulso de quienes, pese a todo, son capaces de aportar ilusión, imaginación e ideas, y que son más de lo que algunos creen. Pero para eso hace falta estímulo y un soporte económico mínimo, especialmente, a los más jóvenes de nuestros médicos (que son nuestra esperanza de futuro) para que, como decía Claudio Bernard, "sometan metódicamente sus ideas a la experiencia de los hechos".

Investigación y desarrollo en salud: un proceso global en el que todos estamos involucrados

Hoy día se habla hasta la saciedad de la necesidad del I+D, entendiendo terminológicamente por tal "investigación y desarrollo". Pero nosotros creemos que esas siglas de I+D esconden tras ellas otros muchos términos: interés, imaginación, información, infraestructuras, dedicación, y, sobre todo, dinero, dinero y más dinero, ya que sin recursos es imposible investigar y desarrollarse. Puede resultar paradójico decir esto en unos tiempos en los que lo que predomina es la economía de la salud, centrada por frases como la que reza que "la salud no tiene precio...", pero tiene unos costes". Costes que alguien debe asumir, teniendo en cuenta que los recursos son siempre escasos y finitos.

Es indudable que estos hechos a lo primero que deben conducirnos es a lograr el máximo aprovechamiento de los recursos disponibles, mediante una buena estructuración, coordinación e intercambio, a base de compartir, colaborar, integrar, informar y difundir. Algo sin duda difícil dada la indiosincrasia individualista de nuestro país, pero por lo que debemos luchar de nodadamente, habida cuenta que el I+D no es sino el piñón motriz de la innovación y que este complejo del I+D+I es un proceso global en el que todos, en mayor o menor término, estamos involucrados. Un proceso que exige una compleja planificación y gestión que permita que la inversión de recursos (*inputs*), tanto humanos como económicos y materiales, se traduzca mediante un proceso de I+D de excelencia, en la obtención de unos resultados (*outputs*) que demuestren la eficacia del proceso de desarrollo o investigación realizado, mediante publicaciones

no sólo de impacto científico, sino también de divulgación e imagen. Eso aparte del aprecio por determinadas titulaciones, certificaciones y diplomas, amén de patentes útiles. Además, el proceso no debe acabar ahí, limitándose a la creación de unos *papers* de mayor o menor trascendencia, como suelen creer algunos investigadores, sino que mediante un procedimiento de transferencia debe conseguirse que los resultados de una investigación que se han demostrado eficaces se conviertan, además, en efectivos, obteniendo así un rendimiento que se traduzca en cambios en el sistema, en un tratamiento, en la prevención de una enfermedad, en las actitudes (de gestores, ejecutores y receptores), etc. Finalmente, para cerrar el proceso, es preciso aún que los resultados eficaces y efectivos se conviertan en eficientes, mediante un adecuado proceso de ejecución que permita su explotación, dando satisfacción a los usuarios del sistema y proporcionando un concepto de "proceso útil" a los ciudadanos.

Unidades de investigación del Servicio Nacional de Salud

Creemos sinceramente que el papel de la red de UI del SNS, iniciado en 1987 mediante una política de ayudas para infraestructuras cuyas estrategias permitieron en 1992 el nacimiento de la REUNI (Red de Unidades de Investigación), con sus tres tipos de unidades (clínicoepidemiológicas, clínicoexperimentales y mixtas), ha ejercido y debe seguir ejerciendo en el futuro un papel fundamental en el campo que nos ocupa. Estas unidades deben ser consideradas conceptualmente como una estructura formada por un equipo humano, un espacio físico y un material dedicados a la investigación, con la finalidad de facilitar el clima científico necesario para hacer realidad que el hecho investigador sea sustancial a la actividad asistencial y docente de todos y cada uno de los profesionales de la salud. Sus objetivos deben estar centrados en estimular, planificar, orientar y facilitar la "investigación total" en ciencias biomédicas, como base fundamental del desarrollo de la calidad asistencial. Finalmente, deben caracterizarse por ser servicios centralizados, multidisciplinarios y polidependientes (sobre todo en el caso de las UI mixtas), abiertos a su utilización por todos los investigadores que precisen su apoyo, en busca del mayor beneficio en salud para los ciudadanos. Así concebidas, creemos que pueden y deben cumplir adecuadamente con todos los objetivos anteriormente reseñados.

Papel de los centros de experimentación animal aplicada a la medicina humana

Es en este contexto que nos ocupa donde pensamos que los centros de experimentación animal aplicada a la medicina humana pueden lograr al máximo sus objetivos, en el marco de los complejos requisitos que hoy contempla la legislación vigente y que precisa de una acción multidisciplinaria coordinada (R.D. 223/88 y órdenes que lo desarrollan). Estos objetivos pueden esquematizarse de la siguiente forma:

En la práctica clínica. Se ha repetido, y se repite hasta la saciedad, que la medicina es ciencia y arte. La ciencia se aprende en los libros, escuchando a los maestros y en la cabecera de los enfermos. Pero el arte, sobre todo el quirúrgico, que se ejecuta con las manos, exige la adquisición de una serie de "habilidades" que no parece ético ni lógico que se consigan sobre el enfermo. La técnica manual se adquiere con la práctica e implica torpeza en sus inicios, que debe corregirse mediante el ejercicio repetido. De ahí que, idénticas o mayores razones que las que se aducen para ingerir la carne de un animal, considerándolo "de utilidad" en beneficio del hombre, justifiquen su empleo para la adquisición de habilidades por el cirujano, siempre que se evite todo sufrimiento y se cumpla el código ético de la experimentación animal. Sólo así conseguiremos mejorar no sólo el saber, sino también el saber hacer y el saber por qué se hace, que constituye el fundamento de la práctica del cirujano.

Según ello, las directivas de la Unión Europea con respecto a la formación en las especialidades quirúrgicas recomiendan la realización de prácticas de cirugía en animales de experimentación, al tiempo que exigen haber realizado en dichos animales un número mínimo de intervenciones quirúrgicas completas por parte del cirujano en formación; intervenciones que por su complejidad, dificultad o rareza son en algunos casos difícilmente realizables en el hombre durante los períodos de formación. Estas dos cuestiones hacen la práctica quirúrgica en animales de experimentación no sólo conveniente, sino una necesidad ante las nuevas normativas de rango europeo.

Además, no es tan sólo evitar riesgos innecesarios al enfermo, lo que motiva este tipo de formación por evidentes razones éticas, legales y técnicas, sino que existen también claras razones económicas de especial relevancia en unos momentos en los que se insiste en la necesidad de optimizar unos recursos siempre finitos. Así, muchos de los instrumentos que se utilizan tanto en

medicina como en cirugía son de gran precisión, delicado manejo y/o de un único uso (desechables), por lo que su empleo por manos inexpertas supone su deterioro, ruptura o pérdida, con un alto coste económico debido al precio de este tipo de instrumental; lo que puede evitarse en gran manera si el aprendizaje se efectúa con instrumentos de demostración, mucho más resistentes y económicos. En este sentido, se calcula que un residente de cirugía de nuestro sistema MIR efectúa un promedio de cinco intentos fallidos para aprender a manejar los actuales aparatos desechables de sutura automática, cuyo valor promedio oscila alrededor de 600 € por aparato. Aparte del riesgo que se evita al enfermo, el coste del aprendizaje puede reducirse a 2,40 € por intento, utilizando aparatos recargables de demostración sobre animales de experimentación.

Aunque, hoy día, no sólo los cirujanos precisan adquirir habilidades para el desempeño de su práctica clínica. Muchos otros especialistas, no sólo médicos, sino también diplomados en enfermería, considerados en principio como no quirúrgicos, colocan marcapasos, introducen catéteres, practican punciones de todo tipo, etc. Y todas estas técnicas precisan de un aprendizaje que no parece lógico se efectúe sobre el enfermo.

Finalmente, el continuo desarrollo de la tecnología aplicada a la medicina y a la cirugía hace que de modo continuo se apliquen nuevos aparatos e instrumentos a la práctica clínica, para cuyo manejo el mejor especialista precisa de un conocimiento y entrenamiento previos. Todo esto sin olvidar las nuevas, diferentes y sofisticadas técnicas quirúrgicas de mínima invasión (laparoscópica, microquirúrgica, radiología intervencionista, etc.). De ahí que la experimentación aplicada encuentre también un amplio campo en la formación continuada de los especialistas.

En la investigación. En este terreno, la formación encuentra su principal campo en el propio Real Decreto 223/1988 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, que exige taxativamente que toda persona que utilice animales de experimentación tenga una formación y capacitación adecuadas a las funciones y trabajos que vaya a desempeñar.

I+D+I (investigación, desarrollo e innovación)

No nos gustaría terminar sin dejar claro que el proceso de I+D+I, descrito anteriormente, no tie-

ne ninguna posibilidad de desarrollo sin plantearse de entrada una lucha sin cuartel contra demagogias más o menos frustrantes, del tipo del "más vale malo conocido que bueno por conocer". Que es muy posible que como bien escribiera Jorge Manrique: "a nuestro parecer, cualquiera tiempo pasado fue mejor". Por eso es preciso un gran esfuerzo de imaginación, pensando que no hay nada malo en cambiar de ideas de vez en cuando; que lo verdaderamente malo es no tener ideas que cambiar. Porque las ideas, al fin y al cabo, son como las flores: cuando envejecen se marchitan, pero si se podan, se favorece el brote vigoroso de otras nuevas.

Claro que este esfuerzo de imaginación puede resultar completamente baldío si, como ya hemos comentado, no se acompaña de una buena planificación y gestión para que los recursos sean explotados de forma satisfactoria a través de un procedimiento de excelencia que por su eficacia, efectividad y eficiencia resulte en cambios adecuados. Para ello sin duda es preciso basarse en procesos de I+D dirigidos, que tras un estudio previo de las necesidades planteen la eficacia de lo que estamos haciendo, por qué y para qué, en respuesta a esas preguntas clásicas que desde la detección de un proceso (enfermedad) prevalente deben llevarnos a la búsqueda de sus soluciones más adecuadas: ¿dónde estamos en este momento ante la solución de un determinado problema?, ¿dónde queremos llegar? y ¿cómo pensamos hacerlo?

Siempre teniendo en cuenta que, como bien dijo D. Santiago Ramón y Cajal, "el secreto del éxito es muy sencillo y puede resumirse en dos palabras: trabajo y perseverancia". Y que siguiendo a Federico Mayor Zaragoza, debemos esforzarnos en "comprender, anticipar, imaginar: el objetivo es emitir un diagnóstico lúcido sobre el presente e iluminar el camino que debe conducirnos al futuro".

BIBLIOGRAFÍA

- Bergson H. Claudio Bernard. Extrait de son oeuvre. Dhurout, París: Presses Universitaires de France; 1959.
- Calnan J. Coping with research. Londres: Heineman Medical; 1984.
- Lozano R. Cirugía experimental, formación médica y medicina social. Zaragoza: Discurso de Ingreso en la Real Academia de Medicina de Zaragoza; 1997.
- Mathie RT. Principles of surgical research. Londres: Butterworths; 1989.
- Messmer K. El experimento en cirugía. Discurso con motivo de la recepción del Doctorado "Honoris Causa" por la Universidad de Zaragoza. Universidad de Zaragoza; 1993.

Morandeira JR. La experimentación animal aplicada a la investigación y formación en medicina humana. *Rev Exp Anim* 1997;8(1,2):105-11.

Morandeira JR. Los servicios universitarios de apoyo y las unidades de investigación del Servicio Nacional de la Salud: un lugar de encuentro para el desarrollo y transferencia de la investigación en ciencias biomédicas. *Rev Exp Anim* 1995;37-40.

Morandeira JR. Memoria sobre concepto, método y fuentes de la cirugía experimental. Zaragoza: 1992.

Orden del Ministerio de Sanidad y Consumo de 11 de marzo de 1991 (BOE 16, 3, 1991), por la que se

convocan Ayudas para Infraestructura y Financiación de Proyectos de Investigación por el FIS, conjuntamente con el Área de Ciencias de la Salud del Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento (Promoción de I+D en Salud).

Programa de Desarrollo de Unidades de Investigación en Áreas Sanitarias. Memoria FIS; 1989. p. 17-24.

Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo sobre Protección de los Animales utilizados para Investigación y otros fines científicos.

Ulrich K.J. *Gesundheit und Tierschutz*. Duselndorf: Econ; 1985.

DISCUSIÓN

J.C. PASTOR: No quisiera que haya nadie pesimista. El cambio es posible. Los que estamos aquí creemos que la investigación se está desarrollando en España y que las próximas generaciones lo van a tener más fácil que nosotros, de la misma forma que nosotros también lo hemos tenido más fácil que la generación anterior. No en vano, creo que es bueno conocer que las generaciones anteriores han pagado duramente el hecho de que España tuviera una Guerra Civil en la que se descapitalizó, desde el punto de vista intelectual, en la que se cerraron las fronteras y en la que la gente ni salía al exterior, ni tenía ideas, ni podía aprenderlas. Creo que la sociedad española está evolucionando a pasos agigantados. Y los pacientes, cuanto más sepan y más cultos sean, más for-

mación pedirán a sus médicos. No quisiera que quedara la idea de que el cambio no es posible. Es posible y, de hecho, ya se está produciendo.

J.R. MORANDEIRA: El cambio se está produciendo a pasos agigantados. Se ve claramente en la diapositiva que muestra el quirófano que teníamos hace 30 años y el que tenemos ahora. Es lógico pensar que dentro de otros 20 o 30 años las nuevas generaciones tengan auténticas maravillas para poder investigar. Actualmente, estamos en el 0,9% de los recursos dedicados a la investigación. Europa nos pide que se aumente hasta el 2%, así que en un futuro próximo contaremos con el doble de recursos y deberemos aprovecharlo.

Investigación en gastroenterología en el contexto actual de la medicina

E. Quintero Carrión

Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Tenerife.

Introducción

En España, la formación de médicos especialistas con alta capacitación para afrontar la prevención, diagnóstico y tratamiento de las distintas enfermedades ha sido eficazmente resuelta gracias al programa MIR. Este programa, creado hace más de 25 años para la formación de médicos especialistas en España, ha constituido una herramienta de extraordinaria utilidad para mejorar de forma notable la calidad asistencial de la medicina practicada en nuestro país. Sin embargo, hoy día el programa tiene muchas carencias, entre las que destacan: *a)* está dirigido a una formación clínica “exclusiva” de los futuros especialistas; *b)* se ha quedado obsoleto para dar respuesta a la rápida evolución de la medicina actual, y *c)* la dedicación del programa a la formación investigadora de los médicos es prácticamente nula.

En este artículo se analiza, en primer lugar, la situación de la investigación biomédica desde la perspectiva del MIR y los aspectos que condicionan su desarrollo. En segundo lugar, se resume la producción científica de la gastroenterología en España y cuáles son las perspectivas de desarrollo de la especialidad para el siglo XXI.

Investigación desde la perspectiva de los MIR

El programa de formación MIR, tal y como está planteado actualmente, está dirigido a la formación de un único prototipo de especialista, al que, después de su formación y enfrentado a los diferentes entornos laborales, se le pide que sirva para abarcar todas las facetas de su especialidad. Esto no era problemático cuando se instauró hace más de 25 años, porque el volumen de conocimiento y de competencias ligado a una determinada especialidad en aquel entonces era lo suficientemente reducido como para poder abarcarlo en su casi totalidad y de forma relativamente

te eficiente por un único tipo de profesional homogéneo. Sin embargo, en los últimos 10-15 años la situación ha cambiado de forma radical. Se ha producido un gran desarrollo tecnológico y de conocimientos dentro de cada especialidad, de forma que cada día es más inviable que un médico pueda dominar todas las áreas de una especialidad. En un futuro próximo deberán crearse nuevas áreas de conocimiento o capacitación que permitan establecer los distintos niveles de especialización dentro de cada especialidad. Para ello, será necesaria la reforma del actual programa de formación MIR.

Otro de los aspectos “débiles” del actual plan de formación de especialistas es la deficiente formación investigadora de éstos. Esto es en gran parte debido a que muchos centros acreditados para la formación de médicos especialistas no practican la investigación y, por tanto, no pueden transmitirla. Así, al finalizar el periodo MIR, muchos médicos desconocen cuál es la importancia de la investigación biomédica para el desarrollo de su profesión. La mayoría de ellos consideran que lo importante es la práctica clínica y que la investigación sólo es útil para hacer curriculum.

La investigación biomédica es la “esencia” del progreso de la medicina, impulsa y mejora la calidad de la medicina asistencial, aumenta nuestros conocimientos y nuestra capacidad de autocritica. Por ello, la próxima reforma del programa MIR en nuestro país deberá incluir propuestas claras para promocionar y potenciar la formación investigadora de los futuros especialistas. Los médicos en formación deben comprender que la investigación es una herramienta de progreso y calidad de atención al paciente, necesaria para alcanzar la excelencia en el desarrollo de la medicina. La actividad investigadora proporciona el rigor científico necesario para una correcta práctica clínica. Además, es una fuente de recursos que permite mejorar, tanto desde el punto de vista tecnológico como humano, los servicios sanitarios.

rios y nos ayuda a establecer relaciones con otros profesionales tanto en el ámbito nacional como internacional.

Inicio en el proceso de investigación

La investigación no debe entenderse como un "hobby", sino como una actividad que debe ser lo más profesionalizada posible. Antes de introducirse en el campo de la investigación, el MIR debe tener claro que es una tarea que consume muchos recursos materiales y humanos, pero sobre todo mucho tiempo.

Para un MIR la mejor forma de iniciarse en la investigación es integrarse en un grupo consolidado con sólidas líneas de investigación que incluyan, a ser posible, investigación clínica y básica o experimental, y que sea un grupo multidisciplinario. Es decir, que integre investigadores clínicos con otros de disciplinas diferentes, como la biología molecular, la química o la física. Si no existe esa posibilidad en el centro en el que realice su formación MIR, lo más aconsejable es buscar la coordinación con grupos de fuera.

Desarrollo de un proyecto

Para que un proyecto de investigación tenga posibilidades de éxito debe cumplir 4 premisas: 1) debe ser realizable, es decir, disponer de los recursos materiales y humanos necesarios y ejecutable en el tiempo previsto; 2) tiene que ser original y contestar a preguntas no resueltas, de forma que una vez concluido pueda ser divulgado a la comunidad científica independientemente del resultado positivo o negativo de éste; 3) debe tratar un tema relevante, y 4) debe cumplir las normas de ética internacionalmente aceptadas.

En la comunidad científica internacional se dispone actualmente de un amplio consenso respecto a los componentes más importantes de lo que se entiende como código de buenas prácticas científicas (CBPC). Por ello, es necesario que los investigadores recurran a un comité para la integridad de la investigación, encargado de velar por el cumplimiento del CBPC. Generalmente, todo protocolo de investigación que implique estudios con personas requiere la aprobación del comité ético de investigación clínica del centro. Ello minimiza los posibles riesgos del estudio, garantiza la confidencialidad de los datos y el cumplimiento de la normativa vigente para el desarrollo de un proyecto de investigación.

En la primera fase del desarrollo de un proyecto de investigación es indispensable la redacción de éste en forma de una memoria que incluya

antecedentes del tema, hipótesis de trabajo, objetivos, diseño y metodología. Este último apartado debe incluir el tipo y ámbito del estudio, así como datos referentes a la población elegida, representativa de la cuestión que deseamos investigar. Además, deben quedar bien definidos los criterios de inclusión y de exclusión. Finalmente, el proyecto debe incluir un apartado en el que se justifiquen los recursos necesarios para su desarrollo y un presupuesto.

Un aspecto clave en el proceso de elaboración de un proyecto de investigación es la estadística. Es aconsejable consultar con un estadístico en la fase inicial para no cometer errores graves en el diseño del estudio, que muchas veces son irreparables a posteriori. En este sentido conviene siempre hacer un cálculo muestral para determinar el número de individuos que debemos incluir en el estudio. Una cuestión no menos importante es el rigor y la honestidad del investigador en la recogida de datos y en el análisis de sus resultados, para lo que hoy día es necesario tener conocimientos en el manejo de bases de datos y paquetes estadísticos como SAS, SPSS, o BMDP.

La presencia de las unidades mixtas de investigación acreditadas por la administración ha contribuido de forma muy importante en los últimos años a facilitar el desarrollo de la investigación en los hospitales españoles. Estas unidades ofrecen el soporte necesario en distintos aspectos de la gestión administrativa y económica de los proyectos, proporcionan ayuda metodológica e instrumental y ponen al servicio de los investigadores servicios comunes, de interés para varios equipos o líneas de investigación.

Fuentes de financiación

En España es posible investigar en dos ámbitos diferentes: laboratorios de empresas privadas y, de forma mayoritaria, instalaciones dependientes de las universidades, de los diversos organismos públicos de investigación, como el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, el Instituto Nacional de Investigación Tecnológica Agraria y Alimentaria, el Instituto de Salud Carlos III, o de los hospitales públicos, entre otros. Para investigar es imprescindible la inversión monetaria. Mientras que en el sector privado ésta proviene mayoritariamente de la propia empresa, en la investigación pública la única opción es acudir a agentes externos al propio organismo.

En España existen tres niveles de actuación en materia de política científica y tecnológica: la Administración General del Estado, los gobiernos de las comunidades autónomas y la Unión Europea.

En el caso de la Administración General del Estado, el mayor protagonismo le corresponde al Ministerio de Ciencia y Tecnología que gestiona el Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (Plan Nacional de I+D+I) y el Programa de Fomento de la Investigación Técnica. El otro ministerio que dispone de un programa competitivo es el Ministerio de Sanidad y Consumo. El Instituto Carlos III gestiona el denominado Fondo de Investigación Sanitaria, al que pueden concurrir hospitales, universidades, organismos públicos de investigación y empresas con servicios de prevención de riesgos laborales propios.

En cuanto a las comunidades autónomas, todas ellas disponen de políticas de fomento de la investigación científica y de la innovación tecnológica que se desarrollan mediante planes o programas competitivos que se publican en los diarios oficiales de las diversas comunidades autónomas.

Finalmente, los agentes del sistema español de innovación pueden participar en los programas y acciones del Programa Marco de I+D y Demostración de la Unión Europea, cuyas convocatorias se publican en el diario oficial de las comunidades europeas.

En relación con la financiación estatal de la I+D en España, ésta representa actualmente el 1,9 del producto interior bruto, una cifra que está muy por debajo a la de la gran mayoría de los demás socios comunitarios y que queda muy por debajo de la media europea, superando tan sólo los datos de Grecia y Portugal. Por tanto, se puede afirmar que España gasta muy poco en investigación biomédica.

Producción científica de la gastroenterología en España

La situación actual de la investigación básica y clínica en la especialidad de gastroenterología y hepatología queda reflejada en un estudio de Trilla et al, en el que se analizó la producción científica por autores de Alemania, Francia, Holanda, Italia, Suecia y España entre 1993 y 1997. La búsqueda incluyó las 4 revistas de mayor factor de impacto de 10 especialidades médicas. Este estudio constató que gastroenterología y hepatología ocupa la primera posición y es la especialidad que contribuye con un mayor porcentaje de artículos de autores españoles a la producción biomédica mundial (4,2%) y a la de la Unión Europea (14,8%). Si bien estos datos reflejan una buena situación para la investigación española de la gastroenterología, debe añadirse que la producción científica fue muy desigual entre las dis-

tintas comunidades autónomas, estando concentrada fundamentalmente en Cataluña, donde se generó el 42% del total de publicaciones.

Gastroenterología en el siglo XXI

La investigación en gastroenterología en el siglo XXI debe ir dirigida a un control más racional de las enfermedades digestivas, basado en el conocimiento preciso sobre los mecanismos genéticos, moleculares, bioquímicos y celulares implicados en la etiopatogenia de éstas. Ello deberá plantearse con nuevas fórmulas asistenciales e integradoras que garanticen el mejor cuidado posible de los pacientes y el uso más eficiente de recursos, que armonicen al mismo tiempo la asistencia, la docencia, la investigación y la gestión clínica.

En el siglo XXI los cuatro grandes temas sobre los que girará la investigación en gastroenterología son: 1) el cáncer digestivo; 2) la enfermedad inflamatoria intestinal; 3) las enfermedades funcionales digestivas, y 4) la innovación tecnológica. En la actualidad, disponemos de buenas evidencias científicas sobre un 20-30% de los tratamientos que empleamos, siendo el porcentaje aún más bajo respecto a métodos diagnósticos o factores pronósticos. Existen, pues, todavía numerosas "zonas grises" que merecen ser investigadas.

Debemos tener en cuenta que la investigación del futuro en medicina y biología no es únicamente para investigadores biomédicos. De hecho, cada día está más arraigado el concepto de investigación traslacional, que incluye el proceso de transferencia de conocimientos y tecnología (diagnóstica o terapéutica) desde el laboratorio hasta la cabecera del enfermo y viceversa, en grupos más bien reducidos de pacientes. Consiste, en sí misma, en la aplicación de los conocimientos básicos (biología molecular, genética) al proceso asistencial. Un ejemplo del desarrollo futuro de este tipo de investigación lo constituyen las posibilidades derivadas de la secuenciación del genoma humano. La gran cantidad de información derivada de este hecho requerirá un gran sistema de investigación traslacional, en particular centrada en estudios fenotípicos.

Sin duda, la gastroenterología del siglo XXI tendrá un componente importante basado en la genómica y la proteómica, disciplinas que van a permitir implementar nuevos tratamientos alternativos (p. ej., terapia génica), el desarrollo de nuevos procedimientos diagnósticos y una mejor capacidad para predecir y evaluar riesgos (medicina predictiva).

Conclusiones

La investigación biomédica mejora la calidad asistencial y debe fomentarse como una actividad esencial en la práctica de la medicina moderna.

Es necesario mejorar la formación investigadora de los médicos en formación y potenciar la investigación de calidad en los hospitales españoles, crear institutos biomédicos multidisciplinares en los que se fomente la investigación traslacional y reorganizar la asistencia (unidades multidisciplinares).

Los gestores hospitalarios deben considerar la investigación como un producto más de su actividad y adaptar sus estructuras a otras más adecuadas que faciliten la atención integral del paciente y la colaboración directa entre varios especialistas.

Es necesario un marco estable y claro de financiación progresiva de la investigación biomédica en el que se especifique el aumento plurianual del presupuesto.

BIBLIOGRAFÍA

- Bosch X, Rodés J. Pulling basic and clinical research together. *Lancet* 2000;355:730.
- Bruguera M. ¿Está en crisis la investigación clínica en los hospitales españoles? *Med Clin* 2001;117:625-6.
- Cadman EC. The academic physician-investigator: a crisis not to be ignored. *Ann Intern Med* 1994;120:401-10.
- Comisión Europea. Informe de la Comisión. Actividades de investigación y desarrollo tecnológico de la Unión Europea. Informe anual 2001. Bruselas: COM(2001)756 final. <http://www.cordis.lu/es/home.html>
- Decreto 561/1993, de 16 de abril, por el que se establecen los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos. Orden de 26 de octubre de 1992, de acreditación de los comités éticos de investigación clínica.
- Does research make for the better doctors? *Lancet* 1993;342:1063-4.
- Espinosa J, Díaz V, Toribio MA, Rodríguez Farré E, Larraga V, Conde J, et al. La investigación biomédica en España (I). Evaluación del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) a través de los proyectos de investigación financiados en el periodo 1988-1995 a instituciones sanitarias asistenciales (hospitales). *Med Clin* 1999;112:182-97.
- Espinosa J, Díaz V, Toribio MA, Rodríguez Farré E, Larraga V, Conde J, et al. La investigación biomédica en España (II). Evaluación del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) a través de los proyectos de investigación financiados en el periodo 1988-1995 a centros de investigación, facultades y escuelas. *Med Clin* 1999;112:225-35.
- Gisbert JP, Piqué JM. Iniciación a la elaboración y presentación de un manuscrito a una revista biomédica (I). *Gastroenterol Hepatol Continuada* 2004;3:41-6.
- Gisbert JP, Piqué JM. Iniciación a la elaboración y presentación de un manuscrito a una revista biomédica (I). *Gastroenterol Hepatol Continuada* 2004;3:91-5.
- Horton B. From bench to bedside research makes the translational transition. *Nature* 1999;402:213-5.
- Icart MT, Pulpón AM. Cómo cumplimentar una solicitud de un proyecto de investigación en ciencias de la salud. *Aten Primaria* 2000;25:576-83.
- Piqué JM, Arroyo V, Planas R, Pérez-Mateo M, Prieto J. La formación de especialistas en aparato digestivo. ¿Llegó el momento de la revisión? *Gastroenterol Hepatol* 2003;26:427-36.
- Ricoy JR, Carrasco M, Clavería LE. Educación médica e investigación. *Med Clin* 1999;112:259-63.
- Roca J. Cómo y para qué hacer un protocolo. *Med Clin* 1996;106:257-62.
- Rozman C, Rodés J. Métodos para promover la investigación en los hospitales universitarios. *Med Clin* 2001;117:460-2.
- Trilla A, Aymerich M, Giol M, Carné X, Asenjo MA, Rodés J. Análisis comparativo de las publicaciones realizadas por autores españoles (1993-1997) en revistas clínicas con factor de impacto elevado. *Med Clin* 2000;114:609-13.
- Zion D, Guillam L, Loff B. The declaration of Helsinki, CIOMS and the ethics of research on vulnerable populations. *Nat Med* 2000;6:615-7.

DISCUSIÓN

J.R. MORANDEIRA: Se nota que usted es una persona que conoce perfectamente el problema que existe en nuestro país en materia de investigación. En España nos encontramos con un problema de tipo político. Mientras los gestores de sanidad pública a los niveles inferiores (director gerente, director médico, etc.) sean escogidos a dedo en puestos de confianza y por méritos exclusivamente políticos no recibiremos ni

dinero ni apoyo. Por tanto, debemos convencer a los políticos. Si no les convencemos de que lo que hacemos es útil y no conseguimos acabar con esa imagen que existe en contra de la investigación, no conseguiremos más recursos. En EE.UU., por ejemplo, en cualquier centro de investigación una parte muy importante de los presupuestos se dedica al marketing, la difusión y la propaganda, y de esta manera convencen a

la sociedad de que están realizando algo útil y consiguen nuevos recursos. Esto en nuestro país no existe.

E. QUINTERO: No debemos cuestionarnos si realmente es útil realizar investigación clínica en los hospitales. Es evidente que los avances en medicina no son por casualidad. Se producen porque se realiza investigación y se demuestran las cosas. Estoy totalmente de acuerdo en que existe una falta de concordancia entre el mensaje que llega de altas instancias del Ministerio de Sanidad y la realidad diaria en nuestros hospitales, donde en ocasiones los médicos no tenemos ni una mesa para sentarnos. Sin embargo, continuamos haciendo esfuerzos de tiempo y de todo tipo porque estamos comprometidos con nuestra tarea.

J.C. PASTOR: Quisiera hacer algunas puntualizaciones. España no dedica el 0,9% a I+D. Dedicamos el 0,9% a I+D+I, de manera que a la investigación sólo se le dedica un porcentaje ridículo del 0,52%. El resto va a parar a I+D en Defensa. Por otra parte, me parece muy bien que se intenta estimular la investigación, de hecho el Fondo de Investigaciones Sanitarias intentó hace unos años desperdigar proyectos por todo el país dando incluso proyectos pequeños a hospitales pequeños. Ahora se produce el fenómeno contrario, de manera que los proyectos se van agrupando y concentrando cada vez más.

Yo soy uno de los vocales de la Comisión Nacional de Evaluación de la Actividad Investigadora y me encuentro con dos aspectos sorprendentes. Uno, que, si no cambian las cosas, dentro de poco tiempo habrá una concentración de poder y de recursos en determinadas zonas. Y dos, que las patentes no se tienen en cuenta, siendo las publicaciones el único parámetro.

También quisiera destacar que existe un grave problema de continuidad para la financiación de las redes temáticas.

E. QUINTERO: En estos momentos existe una intención de descentralización. La creación de redes de centros y de grupos va a potenciar que centros que tenían poca relevancia tiempo atrás vayan adquiriendo más recursos para sus proyectos. Ésta es una buena idea que ha sido de ayuda, por lo menos en investigación biomédica. Existen aproximadamente 1.358 centros y grupos de más de 500 hospitales en nuestro país que en estos momentos están financiados. Esto se seguirá potenciando siempre y cuando

no se produzca un desencanto por parte de los investigadores, ya que algunos gerentes consideran que la investigación que realizamos desde un hospital altera la actividad asistencial de éste. Sin embargo, algunos parámetros e indicadores de producción con resultados excelentes reflejan todo lo contrario. De manera que todavía existen hospitales que están dirigidos por personas que no conocen la investigación y lo que ésta supone para el entorno sanitario.

F. BOSCH: Quisiera hacer hincapié en un aspecto que has comentado en tu presentación y que comparto: la necesidad de algún tipo de reforma del programa MIR para potenciar la investigación básica durante la formación especializada, sin olvidar también la necesidad de potenciarla durante la licenciatura. Existe bastante discusión sobre si la solución debería ir por este camino o no.

F. SORIGUER: Yo creo que el estatuto intelectual de los médicos está cambiando radicalmente. Romà Gubern, un gran sociólogo catalán, historiador de cine, habla del comisariado. Los médicos no somos trabajadores sino que somos comisariado, y esto es algo que no deberíamos olvidar. Castilla del Pino, un gran psiquiatra cordobés, decía que los pacientes de nuestro tiempo no quieren que les quieran, sólo quieren que los curen. También decía que médicos y pacientes competimos por la tecnología. Y ésta es la gran trampa. No es ocioso seguir preguntándose si la medicina es un arte, una técnica o una ciencia. Muchos médicos siguen creyendo en la fantasía, en el sueño dorado del arte. Muchos más están convencidos de que es una técnica, sobre todo los gerentes. Algunos, en cambio, creemos que es un humanismo científico, y esto es otra historia.

La pregunta sería: ¿qué quiere el sistema de los médicos en este momento? Lo que el sistema quiere de ellos es que sean técnicos y, por tanto, que solucionen el problema de las listas de espera. No quiere que sean científicos, porque esto rompe los esquemas de gestión politizada, de la inversión de los recursos. No es una casualidad que el curriculum científico cada vez sirva menos para poder acceder, por ejemplo, a jefe de servicio.

Creo que se avecinan malos tiempos. La imaginación científica que corresponde al siglo XXI y a la incorporación en Europa lo están resolviendo por otras vías. Por ejemplo, por la introducción, sin ningún tipo de pudor, de la investigación que en esta mesa redonda se ha llamado bási-

ca, y que yo llamo preclínica, en los hospitales para que éstos tengan una investigación. Investigación que no la paga el hospital sino fundaciones, agencias nacionales e internacionales. Se está produciendo una clara dicotomía del personal. Por un lado está el comisariado clásico, el científico, y por otro está el técnico, el que soluciona las listas de espera. Y eso es lo que, en definitiva, quieren los pacientes, que los curen. Y para eso hay que ser técnico.

Y. ÁLVAREZ: Además del problema económico, los médicos residentes nos encontramos con el problema de que para investigar necesitamos tiempo y conocimiento. Hay poca motivación por parte del servicio en el que trabajas, ya que no está llevando a cabo ninguna línea de investigación y con este panorama es difícil iniciar nada. En general, hay poca motivación.

E. QUINTERO: El mensaje no debe ser tan pesimista. Los médicos que acaben de formarse en estos centros tendrán que intentar, cuando opten a plazas de adjunto en otro hospital y si quieren realizar investigación, hacer una buena selección de ese hospital, si es que realmente pueden. Existe el problema real de que muchos centros no pueden enseñar investigación porque simplemente no la practican. Esto se puede solucionar si se incluye la investigación en los programas de formación de los médicos residentes en los próximos años. De esta manera se desacreditaría a aquellos servicios que son incapaces o que no practican esta investigación.

J.R. MORANDEIRA: En estos momentos, en este país, existen tres vías profesionales. Una, la docencia asistencial, otra que es la investigadora, o que tiene una formación científica, y otra que es la dirección y gestión. Si las plazas en investigación del sistema nacional de salud hubieran aumentado una quinta parte de lo que han aumentado en los últimos 25 años las plazas de dirección y gestión por méritos políticos estaríamos al nivel de países como Suecia.

V. ALFARO: Si me permiten la ironía, se debería añadir también en los programas de formación de un residente algún curso de posgrado de gestión de ajuste presupuestario o de recursos humanos. Porque lo habitual es que cuando se pide un proyecto, después de hacer todos los ajustes iniciales, finalmente sólo te dan el 60% de lo pedido y desaparece el becario con el que ibas a contar, con lo cual uno se plantea un trabajo a largo plazo que luego se ve mermado en muchas ocasiones por decisiones externas.

D. GARCÍA-OLMO: Me da la impresión de que existe un mensaje muy negativo y pesimista. Yo, en cambio, que me dedico a la enseñanza de residentes, creo que las cosas están cambiando para bien por tres razones. La primera es que prácticamente todos los residentes que terminan han viajado a América o a Centroeuropa y conocen cómo se trabaja allí y saben que se podría hacer de la misma forma en nuestro país. La segunda es que el entorno laboral va a ser más amable. En nuestro entorno laboral cada vez hay menos paro, ya que cada año salen 4.000 médicos de las facultades de medicina y el Estado necesita 5.000. Ahora se presentan al MIR 7.000 u 8.000 personas. Cuando yo me presenté éramos 25.000. Este nuevo entorno laboral más amable va a permitir sobresalir a las élites, ese grupo que son el motor de los países, y someterlas menos a los políticos. Evidentemente, no todo el mundo puede realizar docencia e investigación básica avanzada porque no todos tienen esa vocación.

La tercera, y última, es que el enfermo cada vez nos va a pedir más resultados. Simplemente daré un dato que se ha publicado recientemente: si un enfermo de cáncer de recto es operado por un grupo de cirujanos que no investiga sobre el cáncer colorrectal, tiene un 30% de posibilidades de recidiva pélvica. Si lo opera un grupo que investiga en este campo, tiene menos del 6%.

¿Es la clínica una ciencia?

Punto de vista de un endocrinólogo

F.J.C. Soriguer Escofet

Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Carlos Haya, Málaga.

Introducción

Quiero, ante todo, agradecerle a la Fundación Dr. Esteve su amable invitación a participar en este seminario en el que, al parecer, los asistentes hemos sido seleccionados por nuestra doble condición de clínicos y de científicos. Si éste ha sido el único criterio, en mi caso han acertado, pues desde casi terminada la carrera de medicina en un muy lejano 1969 he intentado compaginar la actividad clínica con la investigación científica. Clínico de día y científico de noche no siempre ha sido fácil la convivencia entre ambos personajes. Sé que hay muchos clínicos, los conozco y les admiro, que no han tenido la tentación científica, dedican su vida al trabajo clínico, a la atención de los pacientes, al estudio de los casos, a estar al día del progreso en el diagnóstico, en el tratamiento, en el pronóstico, pero también en la semiología, etiología y fisiopatología de las enfermedades que atienden. Pero no han tenido –o sufrido– la pulsión científica, la obsesión por llevar a cabo un proyecto, por estructurar una línea de investigación, por contribuir en las sociedades científicas con proyectos propios, si acaso con casos bien estudiados y resueltos, lo que es desde luego alguna forma de investigación de casos únicos, encomiables e imprescindibles, pero que es un tipo de actividad incorporada a la de la práctica, buena práctica clínica diaria, para la que no hacen falta presupuestos complementarios, intelectuales o de otro tipo. Pertenezco a ese otro grupo que desde muy recién terminada la carrera no ha podido evitar la tentación y ha participado ininterrumpidamente en algún proyecto de investigación, primero de casos, luego de series de casos y más tarde, ya con un grupo de investigación propio, en proyectos de más envergadura, clinicoepidemiológicos o clinicoexperimentales, pero también en proyectos de costes y de investigación cualitativa. Decía que no ha sido fácil esta convivencia entre la urgencia de la clínica y la tentación científica,

y no lo ha sido porque en demasiadas ocasiones han entrado en conflicto. Unas veces por la dificultad de poder compaginar con competencia ambas maneras de estar en la medicina, sobre todo por la imposibilidad material de estudiar bien los casos que con premura reclaman la atención médica y al mismo tiempo desarrollar con dedicación y con competencia el proyecto de investigación que estuviera entre manos, precisamente por tener que satisfacer aquella premura clínica. Pero también por la dificultad de convivencia dentro de la propia biografía emocional de dos maneras de enfrentarse al conocimiento. Un conocimiento subrogado, el del clínico, que, ejerciendo de médium, es capaz de transformarlo en un acto creador, intelectualmente muy satisfactorio pero más aún por el enorme sentido humano y social. Nada hay comparable a la satisfacción que produce la resolución de un caso complejo como consecuencia del estudio y de la reflexión sobre el propio caso. Como no la hay con la satisfacción del descubrimiento en el otro –el paciente o sus familiares– de esa complicidad, en tantas ocasiones más gestual que verbal, que supone el agradecimiento y el reconocimiento de tu saber hacer. Es una emoción directa, inmediata, entrañable, humana, muy humana, suficiente como para justificar toda una vida profesional. En cambio el del acto científico es un conocimiento directo, o al menos esa es la ambición. Si el descubrimiento es el empeño último del investigador, para quienes nos hemos planteado la carrera científica con más modestia, ya tan sólo la repetición de los hallazgos previsibles, hechos por tus propios medios, produce una satisfacción suficiente como para justificar tantas horas de esfuerzo. Pero, al contrario que la satisfacción del acto clínico, el acto científico, no depende tanto de los otros, del éxito de los resultados mismos incluso, sino de la capacidad autocrítica del propio investigador. Si en el acto clínico es imprescindible esperar al final, y em-

pieza y termina con cada acto clínico, con cada paciente, en el acto científico el camino es lo verdaderamente importante, pues es una historia interminable en la que cada paso no es más que la antesala del siguiente. Por otro lado, mientras que el clínico debe, en algún momento, después de un período más o menos largo de reflexión (un período que no siempre puede escoger, pues hay problemas clínicos que no pueden esperar), tomar una decisión, tratar o no, con esto o con aquello, etc. –lo que exige algún grado de certeza–, el científico puede, generalmente, demorar la decisión o incluso proponer aplazamientos de acuerdo con el desarrollo de la investigación, con el convencimiento de que al final, probablemente, haya o no resuelto el problema, si la investigación es adecuada y la línea sugerente, deben aparecer más dudas de las que ha resuelto, de manera que frente a la obligada certidumbre del saber clínico, el balbuceo, la duda y la provisionalidad son virtudes del científico que aquel no se puede permitir. Es posible que para algunos esta convivencia haya sido fácil, pero no lo ha sido para el autor de este texto. Por otro lado, en estos años hemos llegado a la conclusión de que es imposible realizar investigación clínica sin ser un clínico ocupado, con experiencia suficiente, con series grandes de pacientes, pero que al mismo tiempo es, también, imposible realizar buena investigación clínica sin tiempo libre suficiente para ello. Es ésta una aparente contradicción cuya resolución, para colmo, no depende exclusivamente de la voluntad de los autores, ya sean como clínicos o como científicos. La investigación clínica es muy difícil de realizar. El desarrollo y evaluación de nuevas pruebas diagnósticas, la realización de buenos ensayos clínicos y el establecimiento de series largas con tiempo suficiente de observación como para establecer el pronóstico, entre otros, es decir, todo aquello que ha dignificado a la medicina moderna y que ha cambiado la fundamentación de la medicina clínica de la última parte del siglo xx es lo que verdaderamente deberíamos considerar investigación clínica. Pero el empeño es de tal envergadura que muchos clínicos desistimos de ella o al menos desistimos parcialmente para realizar otro tipo de investigación, fisiopatológica o etiopatogénica, celular o en animales o en los propios enfermos, que, siendo también clínica (¡todo es o termina siendo sujeto de la clínica!), está más cerca de la investigación científica, llamémosle convencional. Una investigación que es más fácil de estructurar, pues no exige de los requisitos y procedimientos, bien del trato con seres humanos, bien en el caso de la complejidad organizativa de

la validación de una prueba diagnóstica, de un estudio de casos y controles, de un ensayo clínico o de un estudio de cohortes, por ponerle un nombre genérico a muchas de las posibilidades de la investigación clínica. Naturalmente no pretende este comentario establecer una jerarquía de dificultades en el hacer científico, sino tan sólo dejar constancia de que en última instancia la investigación con seres humanos vivos y enfermos –esos son los sujetos de la clínica– entraña dificultades añadidas, entre ellas el protagonismo del sujeto de la investigación, que no conllevan otros tipos de aproximaciones al conocimiento de la realidad biológica, etc. Esta dejación de la verdadera investigación clínica sobre otros sujetos de atención científica es llevada por algunos clínicos con cierto sentido de culpabilidad, pues, de perdurar en el tiempo, entraña un creciente distanciamiento de la razón inmediata de ser clínico. Frente a esto, la tentación de la investigación fisiopatológica por los grupos de investigación clínica está plenamente justificada y es tan necesaria como inevitable que se caiga en ella, pues hay cuestiones y preguntas que sólo pueden ser formuladas desde la experiencia clínica y que sólo, probablemente, pueden ser contestadas en modelos animales o biológicos, desde la misma sensibilidad clínica desde la que se han formulado. Sin embargo, estas dificultades “existenciales” de los médicos no son nada nuevas. Por la biografía de Maimónides, gran médico judío nacido en Córdoba, escrita por Heschel (1984), podemos conocer que buena parte de su producción teórica la desarrolló cuando era joven, años en los que pudo vivir a costa de su hermano, un próspero comerciante. Tras la muerte del hermano, ya en Egipto, donde había llegado exiliada toda la familia, la fama de Maimónides como sabio y como médico, y también la necesidad de ganarse la vida, le llevaron a ocupar la mayor parte de su tiempo en atender como médico los requerimientos no sólo de los reyes sino también de muchos ciudadanos que le reconocían sus capacidades sanatorias. Maimónides se lamenta en los últimos años de su vida de la dificultad de compaginar el trabajo intelectual y la producción teórica con la labor médica y al tiempo se congratula de poder ser útil a tantas personas que confiaban en él. Consuela saber que de aquello ya han pasado 1.000 años.

Desde el contexto del servicio de endocrinología

Se nos ha pedido que expusiéramos de manera comprensible algunos de los proyectos que

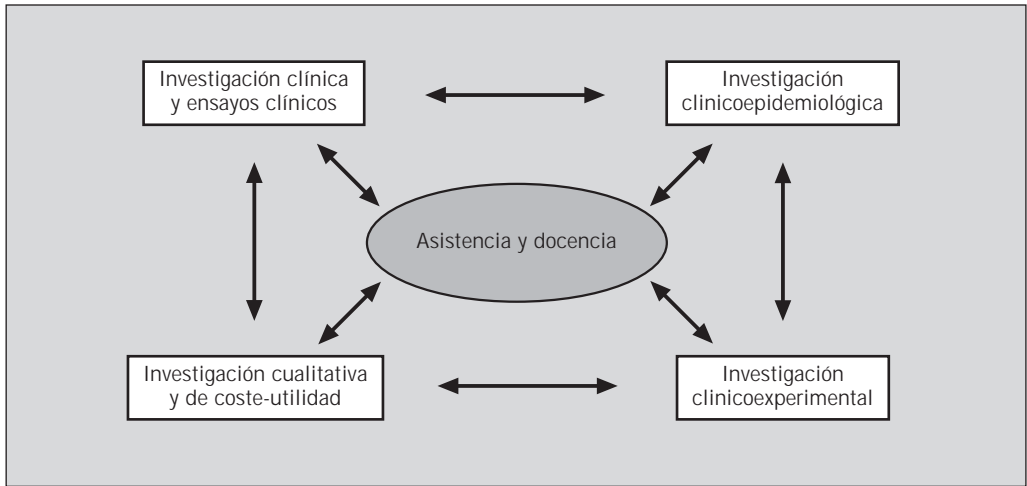


Fig. 1. Organigrama de la actividad científica del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Carlos Haya de Málaga.

podrían identificar esta idea de clínicos comprometidos con la investigación científica. Trabajo y dirijo un servicio clínico, el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Carlos Haya, que atiende entre 20.000 y 25.000 pacientes al año, además de llevar la nutrición del hospital. Como es natural el servicio tiene también una responsabilidad docente, indeclinable en todo grupo organizado de un gran hospital. Ambas son la razón de ser del servicio y a ella nos dedicamos sus médicos. Pero alrededor de las dos y al mismo nivel que ellas el servicio ha organizado la investigación como parte indisoluble de su identidad. Para ello a lo largo de los años se ha ido generando un grupo de investigación que incorpora, además de a los especialistas en endocrinología y nutrición de la plantilla institucional, a biólogos, farmacéuticos y técnicos que contribuyen a los programas de investigación del grupo. Aunque en la vocación organizativa del servicio y desde luego en la mía propia la investigación está al mismo nivel que la asistencia y la docencia, hay una diferencia sustancial. La institución (un hospital de la red pública) no contribuye al mantenimiento de la actividad investigadora del servicio, ni de la infraestructura, ni del personal, que depende exclusivamente de la capacidad de conseguir recursos del propio grupo. La existencia desde hace unos años de una fundación (Fundación Carlos Haya) está contribuyendo de manera notable a solucionar muchos de los problemas de los investigadores del hospi-

tal, pero no propiamente la investigación del hospital, pues el hospital como tal institución carece de los recursos y de los instrumentos para la identificación de la investigación científica dentro de su propio organigrama.

En la figura 1 se resume la racionalidad que justifica la organización de la actividad científica del Servicio de Endocrinología y Nutrición que dirijo. Este organigrama encierra la idea de diálogo entre las diferentes formas de acercarse a la complejidad. La investigación clínica y los ensayos clínicos son la continuación natural de la práctica clínica, la investigación clinicoepidemiológica es la ventana por la que el Servicio de Endocrinología y Nutrición se asoma a la realidad exterior del hospital, la investigación clinicoexperimental es la forma de responder a los interrogantes generados por la investigación clínica y clinicoepidemiológica y que son imposibles de contestar en modelos humanos por razones éticas o de otro tipo y, finalmente, la investigación cualitativa y la de coste-utilidad es la manera que el servicio tiene de encarnar la vocación antropológica de sus miembros, de encarnar sus inquietudes intelectuales en el mundo real de la salud y de la enfermedad. A esta aproximación dialéctica entre el laboratorio y la clínica, entre la clínica y la epidemiología y entre todas ellas y la dimensión cualitativa del conocimiento, no ha sido fácil darle forma, y todavía hoy nos resulta difícil de transmitir a quienes tienen la responsabilidad de asignar recursos y de aceptar modelos de or-

ganización. Sin embargo, después de muchos años podemos decir que es una realidad estructurada y organizada en torno al grupo de investigación CTS-119 del PAI, al propio Servicio de Endocrinología y Nutrición, a la Asociación Maimónides para el estudio de las enfermedades endocrinas, metabólicas y nutricionales, y con la colaboración inestimable de la Fundación Carlos Haya.

Estudio Pizarra

De las diferentes aproximaciones al conocimiento de la complejidad clínica, expuestas con anterioridad, hemos escogido uno de los proyectos que el grupo tiene en marcha como modelo de lo que aquí queremos dejar constancia. Se trata del proyecto Pizarra.

¿Qué es el estudio Pizarra?

El proyecto Pizarra es una investigación científica sobre la población general (la población adulta de Pizarra), con el objetivo de conocer cuál es la frecuencia de los problemas metabólicos y endocrinológicos más relevantes y su asociación con los hábitos de vida, la frecuencia y algunas de las causas y, muy especialmente, aquellas relacionadas con la interacción entre los genes y los hábitos de vida. Como los problemas metabólicos son los factores de riesgo más importantes de padecer enfermedades cardiovasculares, se trata también de un estudio de factores de riesgo cardiovascular. Al ser un proyecto realizado sobre toda la población, se trata de un estudio de salud pública enfocado desde la experiencia clínica de los investigadores.

Expresado con un lenguaje científico, se trata de un proyecto de epidemiología biomolecular, diseñado como una investigación transversal y con previsiones desde el comienzo de convertirse en un estudio de cohortes, con el objetivo de conocer datos de prevalencia y de incidencia de numerosas entidades clínicas o preclínicas y en el futuro su asociación con diferentes factores de exposición.

Se trata, en resumen, de un estudio de epidemiología ecológica, biomolecular y medioambiental, diseñado con dos objetivos:

1. Estudio de la naturaleza humana en su medio habitual, entendida como el resultado de la interacción evolutiva entre la biología (genes) y la cultura (medio ambiente).

2. Convertirse en un banco de pruebas poblacional permanente de cuantas hipótesis científicas

vayan surgiendo sobre la relación *"nature-nurture"*.

Justificación científica del estudio

Las sociedades modernas han conseguido erradicar algunas enfermedades, pero en el camino han aparecido o aumentado la frecuencia de otras muchas. Es el caso de la diabetes mellitus tipo 2 (una enfermedad casi desconocida a principios del siglo xx), la obesidad, la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia, etc. El incremento de estos problemas de salud está relacionado con los cambios en los hábitos de vida de estas sociedades y con la interrelación de estos cambios con la predisposición genética de cada uno de los individuos.

Contra la lotería social

La salud y la enfermedad de todos y cada uno de los individuos que componen una sociedad está determinada por dos "loterías": la genética y la social. Los genes nos vienen dados por la herencia recibida de nuestros padres, que a su vez la recibieron de los suyos y así hasta el comienzo de la especie humana. La social es cambiante y diferente en cada época histórica e incluso de una sociedad a otra. Depende de la cultura de cada momento y de cada comunidad, entendida de manera muy amplia como el conjunto de acontecimientos que definen las relaciones de los hombres. La salud y muchas de las enfermedades de nuestro tiempo son el resultado del equilibrio y la interacción entre estas dos loterías. La gran diferencia entre ellas es que mientras que sobre la lotería genética, hoy por hoy, y probablemente por muchos años, poco se puede hacer, sobre los hábitos y los comportamientos, es decir, sobre la cultura, sí que podemos actuar. Las personas pueden ser pobres o ricas, cultas o incultas, estar paradas o tener trabajo, etc., circunstancias todas ellas que no vienen escritas en ningún código predeterminado e ineluctable y que, por tanto, pueden cambiar, incluso dentro de la propia vida de cada individuo.

El conocimiento de los factores causales de muchos de los problemas de las sociedades de nuestro tiempo es muy difícil, pues son problemas que se van gestando a lo largo de la vida de las personas y es muy costoso en tiempo y en organización diseñar proyectos experimentales que abarquen periodos tan largos. Por otro lado, al ser la mayoría de las enfermedades el resultado de la interacción entre los genes (de cada persona) y los hábitos sociales y culturales (generalmente

compartidos con otros muchos ciudadanos), la mayoría de los estudios no pueden abarcar todas las variables que intervienen en la aparición de esta o aquella enfermedad.

El proyecto Pizarra tiene como objetivo, precisamente, el estudio a largo plazo de estas complejas interrelaciones entre la predisposición genética y la social a la hora de explicar muchos de los problemas sanitarios que aquejan a la sociedad de nuestro tiempo.

Antecedentes

En muchos países se han iniciado hace ya muchos años estudios con estos mismos objetivos. Probablemente el más conocido es el famoso estudio Framingham. Ésta es una pequeña ciudad americana en la que fue iniciado en 1948 lo que después, con el paso de los años, terminaría por convertirse en el más importante proyecto de evaluación y seguimiento de factores de riesgo del mundo. Hoy Framingham es una de las ciudades americanas más conocidas en todo el mundo, precisamente por su protagonismo en este proyecto. Con razón ha merecido el calificativo de una ciudad con corazón [Framingham: a town with heart. *Geriatrics* 1999;54(4):3-4], pues, por un lado, el estudio no hubiera sido posible sin la colaboración de sus ciudadanos, hoy orgullosos de que su ciudad sea conocida por su desinteresada participación en este gran proyecto científico, pero por otro, porque en ella se han producido descubrimientos científicos en el mundo de las enfermedades cardiovasculares como el papel del tabaquismo (1960), la colesterolemia y la presión arterial elevada (1961), la obesidad (1967), la menopausia (1976), o el colesterol-HDL bajo (1987) en la génesis de las enfermedades cardiovasculares. Una ciudad con corazón y una fuente inagotable de información científica de enorme interés sociosanitario donde acuden investigadores de todo el mundo. Pero con el paso de los años otro de los descubrimientos de Framingham, al compararlo con los de otros estudios como el de los 7 países, el Mónica o el de Manresa, es que los resultados de los factores de riesgo allí confirmados, aun siendo universales, tienen importantes excepciones en el ámbito local, algunas de ellas muy importantes, por lo que los resultados no pueden ser trasladados acriticamente, sin más, a otras realidades antropológicas. De aquí la importancia de que se pongan en marcha grandes estudios epidemiológicos en el ámbito local que permitan *in situ* la confirmación, la matización o el descubrimiento de los factores de riesgo que afectan a esta determina-

da población (en este caso la andaluza y por extensión a la española).

¿Cuál es la situación actual del estudio Pizarra?

El estudio comenzó en 1994 como parte de un proyecto de colaboración con otras provincias españolas, habiendo continuado después con vida propia e independiente de aquella primera colaboración. Se han estudiado 1.240 personas adultas entre 18 y 65 años. A todos ellos se les han realizado unas encuestas de salud, un examen y exploración física y unos análisis de sangre, incluyendo una curva de glucosa a la mayoría.

En el momento actual se dispone de una ingente información sociológica, antropométrica, biológica, clínica, nutricional y biomolecular. Mucha de ella ya ha sido procesada y la restante está aún en fase de procesamiento y elaboración.

¿Qué información ha proporcionado hasta ahora el estudio Pizarra?

Es imposible resumir todos los resultados, por lo que tan sólo enunciaremos los más relevantes:

1. Ahora conocemos la prevalencia (frecuencia real) de diabetes mellitus tipo 2 y de otros trastornos relacionados con el metabolismo de los hidratos de carbono. Sabemos que la cifra de diabetes es más alta de lo que se suponía y, sobre todo, que más de la mitad de las personas diagnosticadas desconocían que la padecían. El estudio ha permitido también, por primera vez en España (siendo también uno de los primeros de Europa), conocer la prevalencia de una forma menos frecuente de diabetes mellitus llamada LADA (en inglés, *latent autoimmune diabetes adult*).

2. Conocemos patrones poblacionales de resistencia a la insulina, que es una situación de gran importancia en la explicación de la aparición de la diabetes mellitus tipo 2 y que, sobre todo, nos permitirá en el futuro abordar iniciativas de prevención de la diabetes.

3. Sabemos la prevalencia de obesidad, hipertensión arterial y otros factores de riesgo cardiovascular, pero, sobre todo, hemos podido demostrar que también aquí, en nuestro país, al igual que ocurre en otros grandes estudios europeos y americanos, el factor de riesgo más importante de algunos de ellos son los factores culturales y ambientales, potencialmente prevenibles.

4. El estudio nos está permitiendo conocer los hábitos alimentarios de la población y gracias a

ello hemos podido demostrar, por ejemplo, que el uso inadecuado de los aceites en las frituras es uno de los factores de riesgo de tener hipertensión arterial, o que la ingesta de aceite de oliva previene la resistencia a la acción de la insulina, resistencia que, como se ha comentado con anterioridad, es una condición que favorece la aparición de diabetes mellitus y es un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular, o que el consumo de aceite rico en monoinsaturados (aceite de oliva) se asocia con menor riesgo de ser obeso, etc.

5. También hemos podido ratificar con datos lo que es una experiencia compartida: uno de los grandes factores de riesgo de salud es el sedentarismo.

6. Gracias al estudio Pizarra sabemos que la ingesta de yodo en la población del Bajo Guadalquivir es muy baja, al igual que nos ha permitido conocer los valores de referencia de las hormonas tiroideas, lo que es de gran importancia para los clínicos a la hora de definir la normalidad de algunas pruebas diagnósticas.

7. El estudio está proporcionando información muy valiosa sobre cuestiones que aparentemente tienen menos interés inmediato o para el público en general. Por ejemplo, hemos podido demostrar por primera vez que, en contra de lo que se creía, los anticuerpos contra las LDL (lipoproteína que lleva en la sangre el colesterol "malo"), ni aumentan con la edad, ni tampoco con las concentraciones de colesterol, poniendo en cuestión algunas de las certezas que había sobre este factor de riesgo cardiovascular.

8. En el momento actual, en colaboración con otros grupos, sobre la base de datos biomoleculares de Pizarra se están investigando nuevos genes que parecen predisponer a la diabetes, a la obesidad y a la hiperlipemia. Su confirmación contribuirá de manera muy importante al conocimiento de estos procesos.

9. El estudio ha abordado la fisiopatología de algunos de los factores de riesgo desde una nueva mirada que considera a muchos de estos factores de riesgo como fenómenos inflamatorios. El estudio ha demostrado que la producción de algunas citocinas, como el TNF-RS2, no es independiente del tipo de aceite que habitualmente se consume.

10. Otras muchas cuestiones son analizadas y quedan por analizar todavía más, entre ellas las relaciones entre la información biomolecular y la dieta, ambas ahora en fase de interpretación y estudio.

11. Finalmente, el estudio Pizarra está permitiendo disponer de un grupo control poblacional

para cuantos estudios de casos se pongan en marcha. Así, esto está ya produciéndose con un proyecto coordinado con un grupo de investigadores sobre factores de riesgo cardiovascular de Sevilla.

12. En la actualidad se está aumentando la base poblacional y ha comenzado un estudio prospectivo o de cohortes, con el objetivo de poner a prueba algunas de las hipótesis de relación causal y de interacción genes-medioambiente.

¿Qué se está haciendo y qué se piensa hacer con la información que se va obteniendo?

En primer lugar, el estudio está planteado como un examen de salud personal, por lo que los resultados de la evaluación clínica y de las pruebas realizadas han sido remitidos a cada uno de los participantes con la recomendación de visitar a su médico de cabecera en caso de detectar alguna anomalía. En este sentido cada uno de los participantes se ha beneficiado de un "chequeo" personal.

Por otro lado, la investigación nutricional ha tenido también el empeño de convertir el estudio en una fuente de educación alimentaria. No era otro el objetivo cuando las dietistas que visitaban los domicilios durante la evaluación nutricional regalaban como contrapartida a la colaboración una muestra de aceite de oliva virgen, con el deseo de estimular el uso de este aceite, cuyas propiedades biológicas están empezando ahora a ser conocidas, entre otros aspectos, gracias a los resultados del estudio Pizarra.

En segundo lugar, el investigador principal y director del proyecto se ha entrevistado en varias ocasiones con responsables sanitarios informándoles de los resultados que iban apareciendo, incluso antes de ser publicados, pues el estudio tienen una clara vocación de investigación en salud pública al servicio del diagnóstico de salud de la población. Los investigadores de este estudio somos conscientes de que tan sólo podremos llegar a conocer un poco mejor la realidad, quizás a ser agentes educativos, pero que las grandes transformaciones e inversiones que modifiquen esta realidad tienen que venir de los responsables públicos y de los representantes elegidos democráticamente por los ciudadanos.

En tercer lugar, los resultados del estudio son periódicamente elaborados en forma de memoria justificativa ante las agencias nacionales e internacionales que han financiado la mayor parte del estudio, agencias que deben dar el visto bueno de esta justificación. Estas memorias son también el mejor control de calidad del proyecto.

En cuarto lugar, los resultados están siendo publicados para conocimiento de la comunidad científica. Como se ha comentado al principio, el estudio Pizarra es un proyecto científico de investigación en epidemiología biomolecular. Como cualquier otro proyecto científico, los resultados deben ponerse a disposición de todo el mundo. Por muchas razones. En primer lugar, éticas, pues los investigadores sólo somos agentes en la búsqueda del conocimiento, pero no sus propietarios. El conocimiento pertenece a la humanidad. Además, porque es la mejor garantía de la validez de los resultados, pues al someterlos a la opinión de la comunidad científica los resultados van a ser inmediatamente criticados, rechazados o aceptados por las personas más expertas en el campo del conocimiento que aquí abordamos. Finalmente, porque la mayor parte del estudio Pizarra ha sido hecho, hasta ahora, con financiación pública y sólo haciendo públicos los resultados se puede garantizar la rentabilización de esta inversión.

Estos resultados¹⁻¹¹ se han publicado o se han enviado para su publicación, estando otros en fase de elaboración. Los originales pueden consultarse vía Internet, los originales en español pueden solicitarse a los investigadores y en un futuro próximo consultarse en la página web que se está elaborando al respecto.

¿Cómo se ha financiado hasta ahora el estudio Pizarra?

Todos los recursos para la realización del proyecto se han conseguido hasta ahora en régimen de concurso público en las convocatorias de las agencias autonómicas, nacionales e internacionales de financiación de la investigación. El significado de esta financiación es doble:

1. La calidad de los investigadores y de los sucesivos proyectos ha sido evaluada por las agencias de investigación de mayor prestigio, como el

Fondo de Investigación Sanitaria, el Instituto Carlos III, la Agencia Nacional de Evaluación, las convocatorias de la Junta de Andalucía o los Planes Marco de Investigación Científica de la UE, en régimen de competencia con el resto de los investigadores de todo el país.

2. La financiación es pública y, por tanto, independiente de otros intereses.

El proyecto ha recibido también modestas pero decisivas financiaciones de la Asociación Maimónides para el Estudio de las Enfermedades Endocrinológicas y Nutricionales, vinculada al Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Carlos Haya.

Finalmente, el estudio gozó en la fase inicial del apoyo del Ayuntamiento de Pizarra, así como del Centro de Salud de Cártama-Estación y del Distrito Sanitario del Guadalhorce, que puso a nuestra disposición locales y la colaboración inestimable de personal de enfermería.

En la actualidad el proyecto ha llegado a un acuerdo con el Ayuntamiento de Pizarra que ha cedido un local para la institucionalización del proyecto en dicho pueblo.

¿De cuánta financiación ha dispuesto hasta ahora el proyecto?

En la tabla I se resume los recursos conseguidos, la fuente de financiación y los plazos de ejecución de cada proyecto.

¿Quién es el responsable del proyecto y quiénes son los investigadores?

El proyecto es una iniciativa del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Carlos Haya, inicialmente en solitario y actualmente en colaboración con la Fundación Carlos Haya para la investigación.

El coordinador general de los sucesivos proyectos que componen el estudio Pizarra es Fede-

TABLA I
FINANCIACIÓN DEL PROYECTO PIZARRA

<i>Agencia financiadora</i>	<i>Años</i>	<i>Financiación (€)</i>
Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto Carlos III)	1995-2005	128.835
Consejería de Salud de la Junta de Andalucía	1998-2003	13.380
Fondo Europeo Desarrollo Regional	1997-2001	158.665
Fondo Europeo Red de Centros	2003-2005	150.000

TABLA II
PARTICIPANTES EN EL PROYECTO PIZARRA

Servicio de Endocrinología y Nutrición (Hospital Universitario Carlos Haya)

Federico J.C. Soriguer Escofet (médico endocrinólogo)
 Isabel Esteva de Antonio (médico endocrinólogo)
 María Soledad Ruiz de Adana (médico endocrinólogo)
 Francisco Tinahones Madueño (médico endocrinólogo)
 Manuela Beltrán (técnico especialista en nutrición)
 José Manuel García Almeida (médico endocrinólogo)
 M. Cruz Almaraz Almaraz (médico endocrinólogo)

Servicio de Endocrinología y Nutrición (Fundación Carlos Haya)

Gemma Rojo Martínez (biólogo bioquímico clínico)
 Juan Miguel Gómez-Zumaquero (biólogo)
 Sonsoles Morcillo Espina (biólogo)
 Fernando Cardona Díaz (biólogo)
 Eduardo García Fuentes (farmacéutico analista clínico)
 Begoña Cano (técnico especialista en nutrición)
 Patricia Soares (técnico especialista en nutrición)
 José Maldonado (médico)
 Elvira García (médico)
 Isabel Cardona González (diplomado universitario en enfermería)
 Víctor Martín Hurtado de Mendoza (médico)

Unidad de Investigación (Hospital Universitario Carlos Haya)

Araceli González (diplomado universitario en enfermería)

Centro de Salud de Cártama Estación

Marieta Catalá (médico)
 María José Merelo (médico)
 Isabel García (diplomado universitario en enfermería)
 Salvador Alarcón (diplomado universitario en enfermería)

rico J.C. Soriguer Escofet, Jefe del Servicio de Endocrinología y Nutrición y Director del Grupo de Investigación CTS-119 de la Junta de Andalucía.

En la tabla II se presentan los investigadores que a lo largo de estos años, en diferentes momentos y con diferentes responsabilidades han participado en el estudio.

Futuro

El proyecto Pizarra nació desde el principio con una clara vocación de futuro. En estos años ha ido dando, uno tras otro, pequeños pasos hasta llegar al momento actual, en el que se ha comenzado la segunda fase del estudio en la forma

de lo que en un lenguaje científico y epidemiológico se denomina un estudio de cohortes y que no es más que un estudio prospectivo con el objetivo de saber qué ha ocurrido con aquellas personas que fueron estudiadas ahora ya hace más de 5 años, en función de los datos que se obtuvieron en ese momento. Preguntas del tipo: "¿tiene mayor riesgo de padecer diabetes una persona que hace 5 años tuviera tal peso o tales concentraciones de insulina en sangre, era o no sedentaria, tenía tal o cual polimorfismo genético...?", ahora estaremos en disposición de contestarlas.

El interés de tener respuestas a este tipo de preguntas no se le escapa a nadie, y el estudio

Pizarra está ahora en condiciones de abordarlas, pues desde el punto de vista científico este tipo de estudios prospectivos tienen una enorme solidez y son los únicos que pueden dar respuesta sobre la causalidad de los factores de exposición.

Un estudio como el que está en marcha en Pizarra, sobre todo en esta segunda fase que ahora presentamos, exige constancia, tenacidad, recursos y tiempo. También entusiasmo y una cierta capacidad de imaginar el futuro. Desde luego, un requisito imprescindible es tener un buen estudio transversal, una sólida y amplia información básica como la que se ha venido construyendo desde 1994.

En última instancia, el proyecto Pizarra tiene como objetivo convertirse en un banco de pruebas, en un laboratorio natural donde puedan contrastarse cuantas hipótesis epidemiológicas o clínicas se sugieran, que permitan, al adjudicar valores numéricos a la incertidumbre, transformar la (vieja) incertidumbre en (el moderno concepto de) riesgo. Todo esto lo contiene el estudio Pizarra. Por eso Pizarra es una gran oportunidad para la ciencia.

Reflexiones sobre la ética del proyecto Pizarra

Los responsables del proyecto saben que la investigación científica no es neutral y que no puede ser indiferente a las consecuencias y a la utilización que se haga de los resultados. Éstos son algunos de los mecanismos de control que se han previsto.

En primer lugar, se están estableciendo, y se establecerán en el futuro, diagnósticos de salud poblacional que deben tener el mismo rigor, o más, que el diagnóstico realizado a una persona individual. Contrastar estos resultados y someterlos a la crítica de la comunidad científica será la mejor garantía y validación de éstos.

En segundo lugar, se pueden crear expectativas en la población estudiada que no puedan ser luego suficientemente satisfechas. La transparencia en el desarrollo y en los intereses del proyecto es la manera en que los responsables del proyecto han intentado evitar posibles malos entendidos y este mismo documento, que es un documento público, está al servicio de esta transparencia.

En tercer lugar, y como ya se ha comentado, uno de los objetivos más novedosos del proyecto es la investigación a largo plazo de las interrelaciones entre los genes y el medio ambiente. El estudio conlleva la obtención de información sobre hábitos de salud y sobre marcadores biomoleculares de riesgo. Los investigadores han diseñado

mecanismos para garantizar la confidencialidad de toda la información, colocándose bajo el control de las leyes vigentes sobre protección de datos y asumiendo el compromiso público y legal de respetar esta confidencialidad, así como de garantizar que toda la información obtenida sea sólo usada para los fines científicos contenidos en el proyecto.

Finalmente, los sucesivos proyectos han sido, y tendrán que seguir siendo en el futuro, evaluados y autorizados por las comisiones de ética de las instituciones desde las que se presenten los proyectos, comisiones que tienen entre sus funciones, precisamente, garantizar el buen uso de la información.

¿Cuáles son los beneficios que puede obtener la población de Pizarra con este estudio?

En el ámbito individual, de una manera bastante cómoda y gratuita, cada uno de los participantes en el proyecto se beneficiará de chequeos periódicos de salud. En el ámbito municipal la identificación de Pizarra con un estudio de estas características permitirá, con toda propiedad, reconocer a Pizarra como una ciudad saludable, un objetivo que muchas ciudades pregonan sin que hayan hecho por ello el menor mérito, salvo el disfrutar de un determinado clima o algún otro privilegio de la naturaleza local. Pero también podrá distinguirse como ciudad solidaria, pues todo el conocimiento que se ha obtenido y que se seguirá obteniendo con la colaboración de los ciudadanos de Pizarra no sólo les beneficiará a ellos sino a otros muchos en cualquier parte del mundo, pues el conocimiento ni tiene, ni puede, ni debe tener barreras y tiene que ser el patrimonio de toda la humanidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Soriguer F, Esteva I, Rojo-Martínez G, Ruiz de Adana MS, Dobarganes MC, Garcia-Almeida JM, et al. Oleic acid from cooking oils is associated with lower insulin resistance in the general population (Pizarra study). *Eur J Endocrinol* 2004;150(1):33-9.
2. Soriguer F, Rojo-Martínez G, Esteva I, Ruiz de Adana MS, Catalá M, Merelo MJ, et al. Prevalence of obesity in south-east Spain and its relation with social and health factors. *Eur J Epidemiol* 2004; 19(1):33-40.
3. Gómez-Zumaquero JM, Morcillo S, Soriguer F, Tinahones FJ. Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma2 gene is related to increased levels of oxidized low-density lipoprotein (LDL) autoantibodies in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2003;52(12):1648.

4. Soriguer F, Esteva I, Rojo-Martínez G, Ruiz de Adana MS, Catalá M, Merelo MJ, et al. Prevalence of latent autoimmune diabetes of adults (LADA) in Southern Spain. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 56(3):213-20.
5. Tinahones FJ, Gómez-Zumaquero JM, Rojo-Martínez G, Cardona F, Esteva I, Ruiz de Adana MS, et al. Increased levels of anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies are associated with reduced levels of cholesterol in the general population. *Metabolism* 2002;51(4):429-31.
6. Millón JM, Soriguer F, Muñoz R, Mancha I, Gómez-Huelga R, Goiburú E, et al. Los determinantes de la yoduria en una población del sur de España. *Endocrinología* 2001;48:104-9.
7. Soriguer F, Rojo-Martínez G, Esteva I, Ruiz de Adana MS, Catalá M, Merelo MJ, et al. Ejercicio y factores de riesgo cardiovasculares y metabólicos en la población general. *Med Clin (Barc)* 2003; 121(15):565-9.
8. Soriguer F, Rojo-Martínez G, Dobarganes MC, García Almeida JM, Esteva I, Beltrán M, et al. Hypertension is related to the degradation of dietary frying oils. *Am J Clin Nutr* 2003;78(6):1092-7.
9. Esteva I, Ruiz de Adana MS, Merelo MJ, Millón MC, Soriguer F, Rojo-Martínez G, et al. Prevalence of subclinical autoimmune thyroid disease in southern Spain. *Eur J Endocrinol*. En prensa.
10. Rojo-Martínez G, Esteva I, Ruiz de Adana S, Catalá M, Merelo MJ, Tinahones F, et al. Patterns of insulin resistance in the general population of southeast Spain. *Diabetes Res Clin Pract*. En prensa, tentativa de publicación: septiembre, 2004.
11. Morcillo S, Cardona F, Rojo-Martínez G, Esteva I, Ruiz de Adana MS, Tinahones F, et al. Association between MspI polymorphism of the Apo AI gene and type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*. En prensa.

Investigación básica en oftalmología

J.C. Pastor Jimeno

Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, Universidad de Valladolid.
Servicio de Oftalmología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Introducción

Aunque es para mí un honor haber sido invitado a participar en este foro, ese sentimiento de oportunidad inmerecida no me oculta el "shock" que me produjo el recibir el programa y ver el tema que me habían asignado: yo no puedo hablar de investigación básica, no la he hecho nunca.

Llamé al Dr. Videla y él me sugirió, muy amablemente, que contara alguno de los proyectos de investigación en los que estoy trabajando. Entonces el sentimiento se volvió hacia vosotros. ¿Qué mal me habíais hecho para que durante 20 minutos os aburriera con un tema que seguramente no os interesa lo más mínimo?

Por eso he cambiado no sólo la orientación sino el tema de mi charla y os voy a contar la historia del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, un Instituto de la Universidad de Valladolid que pretende conseguir que los oftalmólogos, es decir, unos clínicos, hagamos investigación.

Pero antes, y tras volver a reconocer públicamente que me resulta imposible hablar de investigación básica en oftalmología, quiero comentar brevemente el significado de algunos términos que a veces empleamos sin demasiada atención. Me refiero a las siglas I+D+I, que casi todo el mundo ha utilizado alguna vez:

Investigación. Es toda indagación original y planificada que persiga descubrir nuevos conocimientos y una comprensión superior en el ámbito científico o tecnológico. Puede ser de tres tipos:

1. *Básica.* Dirigida a adquirir nuevos conocimientos sobre el fundamento de los fenómenos y de los hechos observables.
2. *Estratégica.* Básica orientada hacia áreas emergentes de conocimiento, con posible impacto económico y social en una región.
3. *Aplicada.* Dirigida hacia un fin u objetivo práctico determinado.

Desarrollo. Es la aplicación de los resultados de la investigación o de cualquier otro conocimiento científico para la fabricación de nuevos materiales o productos, o la mejora de procesos de producción, o la mejora sustancial de productos o procesos ya existentes.

Innovación tecnológica. Es un proceso cuyo resultado es la obtención de nuevos productos o servicios o procesos de producción, o de mejoras sustanciales de los ya existentes y tecnológicamente significativos.

La mezcla de estos tres conceptos da lugar al acrónimo ya famoso del I+D+I.

Está claro, según estos conceptos, que es difícil que un oftalmólogo clínico como yo se dedique a la investigación básica, pues me faltaría preparación. Así pues, voy a hablar de la investigación que llevamos a cabo en oftalmología en España, fundamentalmente aplicada.

Puede parecer fácil que un oftalmólogo haga investigación, pero la realidad es que aunque nuestra especialidad, al menos en el último siglo, ha aportado grandes cirujanos, hasta la década de 1980, la contribución de la oftalmología española a la ciencia era prácticamente nula.

Un poco de historia

Hacia finales de la década de 1980, con la universidad estructurada en departamentos, según la Ley de Reforma Universitaria (LRU), y con estos órganos centrados en la docencia de primer y segundo ciclo, resultaba bastante claro que el departamento al que pertenecíamos no era el lugar más adecuado para realizar investigación.

Pero la LRU, duramente debatida y criticada, abrió la puerta a una nueva figura: los institutos universitarios, concebidos como lugares dedicados a la investigación multidisciplinaria y a la docencia de tercer ciclo.

Con ese marco jurídico, un grupo de profesores de la Universidad de Valladolid iniciamos la aventura de poner en marcha un instituto: el Instituto de Oftalmobiología Aplicada de la Universidad de Valladolid, conocido ahora como IOBA.

El nombre se lo puso un catedrático de farmacología clínica que fue su primer director y quiso dejar claras dos cosas: el Instituto era multidisciplinario, de ahí lo de oftalmobiología, y nuestra investigación tenía que ser aplicada.

En 1989 la Junta de Gobierno de la Universidad dio su aprobación al proyecto, y 5 años más tarde, tras una evaluación por la Agencia Nacional de Evaluación y Prospectiva, el Consejo de Ministros aprobó la creación del IOBA.

Los objetivos institucionales del IOBA recogidos en el Real Decreto de su aprobación (diciembre de 1994) son: la investigación en el conocimiento de las bases biológicas y los métodos diagnósticos y terapéuticos de las enfermedades oculares, y la aplicación de tales conocimientos a la prevención, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación de dichas enfermedades.

Desde un primer momento imaginamos el Instituto con tres áreas: la docente (focalizada en el tercer ciclo y en la formación posgraduada), la investigadora y la asistencial. Pues muy mal podemos ejercer las otras dos si no hay un “volcado” continuo de toda la actividad hacia la mejora del cuidado de los pacientes, fin último del Instituto. Éste ha sido uno de los temas más críticos. Con los hospitales universitarios transferidos a la sanidad pública había que crear una estructura que pudiera atender pacientes, pero que perteneciera a la Universidad.

En 1994, con la aprobación ministerial, diseñamos la investigación del Instituto en dos grandes áreas: la investigación preclínica y la clínica. Y comenzamos a desarrollar la que, como clínicos, nos parecía más compleja, es decir, la preclínica.

El primer grupo, el más antiguo, se iba a dedicar al estudio de la superficie ocular. En concreto trabajarían en el ojo seco, las alergias oculares, los efectos de la cirugía refractiva y pretendían realizar autotrasplantes de conjuntiva humana.

El segundo grupo se encargaría de la oncología ocular, en realidad al estudio del melanoma uveal. Iban a estudiar las nuevas opciones terapéuticas y la identificación precoz de metástasis subclínicas mediante la expresión de determinadas proteínas relacionadas con las células del melanoma.

El tercer grupo es el de glaucoma, que se orientó hacia estudios de prevalencia de esa enfermedad en nuestro medio. Hacia la evaluación

de la nueva tecnología, que en esta subespecialidad es imparable, y hacia la evaluación clínica de un concepto que es apasionante, pero que todavía no sabemos medir: la neuroprotección.

El cuarto grupo es el de retina, el que yo dirijo.

Dos temas nos iban a obligar a invertir nuestro tiempo, los efectos de la inflamación ocular en la reparación vitreoretiniana, algo que nos trae de cabeza a los que tratamos desprendimientos de retina, y la retinopatía diabética en su vertiente de identificación de factores de riesgo y protección.

En aquel momento, hace ya casi 10 años, veíamos una serie de problemas para nuestro desarrollo como investigadores: la sociedad no nos “reconocía” fácilmente nuestra capacidad investigadora, puesto que nos veían como meros clínicos. No había un reconocimiento efectivo de la universidad hacia la actividad multidisciplinaria. Las compañías farmacéuticas estaban poco interesadas en la investigación preclínica que llevábamos a cabo y nos faltaba “masa crítica”. Existían pocos grupos de investigación en la oftalmología y, además, estaban dispersos.

A todo ello se unía la relativamente escasa financiación de la investigación aplicada en nuestro campo.

En 1999, durante la celebración del Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología, se nos invitó a reflexionar sobre la investigación que se llevaba a cabo en nuestra especialidad por aquel entonces y expusimos estos problemas.

Instituto de Oftalmobiología Aplicada en el año 2004

¿Qué ha sucedido en estos casi 15 años?

El Instituto ha crecido y en estos momentos trabajamos unas 80 personas, 60 de las cuales están contratadas por la Fundación General de la Universidad de Valladolid.

Ocupamos un espacio provisional de unos 1.500 m² en la Facultad de Medicina, pero el año pasado la Universidad consiguió dinero de fondos FEDER para un edificio propio que comenzará a construirse este año.

Hace 3 años pudimos incorporar a dos economistas que, entre otras cosas, nos han ayudado a realizar y hacer cumplir un presupuesto anual y nos proporcionan una contabilidad analítica.

Para este año el presupuesto del IOBA está por encima de los 3 millones de euros, de los que el Instituto genera el 98%.

¿Qué ha pasado con la investigación?

Los 4 grupos que comenzaron en 1994 siguen funcionando y sus líneas de investigación prácticamente no se han modificado. Pero hace un año, se añadió una Unidad de Ensayos Clínicos, coordinada por un oftalmólogo, con un farmacólogo clínico de apoyo, una enfermera como Clinical Research Assistant y una Unidad de Garantía de Calidad.

Además, el IOBA pertenece a un consorcio de 14 centros europeos, denominado EuroEye, que pretenden compartir protocolos, procedimientos normalizados de trabajo y ofrecer a la industria farmacéutica una organización europea capacitada para desarrollar de forma rápida y eficiente ensayos clínicos.

En el IOBA en los últimos 3 años se han realizado 8 ensayos y en estos momentos hay tres más en comienzo. Empezamos pues a desarrollar la investigación clínica con la que habíamos soñado hace 15 años.

Pero no descuidamos la preclínica y, además de los grupos, se ha creado una figura nueva: los denominados programas. Se trata de actividades de investigación que intentan "unir a los grupos" de forma horizontal.

En estos momentos existen tres programas, comentados a continuación.

Programa de investigación en enfermedades de la superficie ocular

Se trata de un programa centrado en las enfermedades inflamatorias de la denominada superficie ocular, entre las que destacan el síndrome de ojo seco y la alergia ocular. Es un programa multidisciplinario diseñado para aumentar los conocimientos sobre estas enfermedades con el fin último de buscar nuevas estrategias terapéuticas que puedan curar o, por lo menos, detener la progresión de dichos procesos inflamatorios.

Se desarrolla en colaboración con Allergan Inc (Irvine, California, EE.UU.) y Allergan Ltd (High Wycombe, Reino Unido) y consta de tres objetivos fundamentales para los años 2003-2008:

1. Profundización en la patogenia del síndrome de ojo seco y la alergia ocular para encontrar nuevas alternativas terapéuticas.

2. Colaboración en la realización de ensayos clínicos.

3. Colaboración en acciones de formación y marketing.

El presupuesto básico para el desarrollo general del programa es de 1.000.000 \$ americanos en 5 años.

Programa de iluminación y baja visión

En el año 2001 el IOBA comenzó un programa enfocado a aumentar el conocimiento sobre la baja visión y las posibilidades de la rehabilitación visual entre la sociedad en general, oftalmólogos, ópticos, optometristas y el personal que se dedica a la atención de personas mayores.

Se ha construido un laboratorio de iluminación para realizar pruebas de visión con la iluminación controlada y para servir como referencia de iluminación para la baja visión.

Además, la unidad clínica correspondiente ha ido creando una base de pacientes que está permitiendo la realización de proyectos aplicados como la evaluación de la influencia de las ayudas visuales en la calidad de vida de los pacientes, la eficacia de algunos sistemas específicos de ayuda basados en tecnología digital o la influencia de la iluminación en la sensibilidad al contraste.

En este proyecto colaboran, por el momento, las empresas Essilor España e Indalux SA, que participan en el programa de doctorado.

Programa de teleoftalmología

Este programa se basa en la aplicación específica en el campo de la oftalmología de las nuevas tecnologías y tiene una finalidad docente y asistencial.

El IOBA, con el patrocinio de la Junta de Castilla y León, está desarrollando un programa ambicioso desde el año 2000, que ha dado sus frutos en forma de una experiencia piloto, desarrollada en los centros de salud de Piedrahita y el Barco de Ávila, debido tanto a sus características orográficas como de población, que plantean serios problemas de desplazamiento y de asistencia médica especializada. Se ha entrenado a los médicos de atención primaria y éstos controlan los fondos de ojo de sus pacientes enviando imágenes y evitando desplazamientos a más del 93% de la población.

Problema de la masa crítica

En las reflexiones de 1999 se apuntaba que uno de los problemas era que en nuestro país existían pocos grupos de investigación en oftalmología y ciencias de la visión, y que, además, trabajaban de forma aislada.

Desde el Instituto se ha intentado agrupar, de forma funcional, a distintos investigadores de otros centros implicados en proyectos parecidos. Y así, desde abril de 1999 el IOBA está reconocido como Unidad Asociada del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) a través del Instituto de Óptica Daza Valdés, con el que se colabora en calidad de visión y en el programa de baja visión e iluminación.

Pero el paso más importante se dio en el año 2003, cuando el Instituto de Salud Carlos III, dependiente del Ministerio de Sanidad, propuso la creación de las denominadas Redes Temáticas de Investigación Cooperativa. Existen dos tipos, las de centros y las de grupos.

De centros sólo hay 13, y una de ellas es la de oftalmología, de la que el IOBA forma parte junto con el INGO (Santiago de Compostela), el Instituto de Oftalmología Experimental (Murcia), el Laboratorio de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo (Madrid), el IOA (Alicante) y el Servicio de Oftalmología del Hospital Miguel Servet (Zaragoza).

Todavía es pronto para ver los frutos de esta apuesta ministerial, pero los investigadores de los diferentes centros han empezado a compartir cosas.

Y una de ellas, de la que, además, nos sentimos muy orgullosos, pues fue idea de nuestro Instituto, es un programa de doctorado interuniversitario en ciencias de la visión.

Desde el año 2000 el IOBA, junto con el Departamento de Óptica Aplicada de la Universidad de Valladolid, el Instituto de Óptica Daza Valdés (CSIC) de Madrid y los Departamentos de Oftalmología, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica (Área de Oftalmología) y también el de Física (Óptica) de la Universidad de Murcia organizan un nuevo programa de doctorado cuya meta es la formación de investigadores en los aspectos tanto biomédicos como físicos (ópticos) en las ciencias de la visión desde una perspectiva multidisciplinaria, aplicada y de calidad. Este año se ha incorporado la Universidad de Coimbra, y para el próximo curso lo harán el resto de las universidades de la red.

El programa tiene dos bloques de formación, con diversos cursos específicos y uno común, denominado "Fundamentos de la visión", que establece el nivel mínimo de conocimientos generales que todos los estudiantes deben tener de los aspectos anatómicos, histopatológicos, genéticos, ópticos, fisiológicos y oftalmológicos (clínicos) del proceso de la visión. De los dos bloques, uno tiene un enfoque físicoóptico y se orienta fundamentalmente a la formación en los aspectos

ópticos de la visión (es decir, cursos de óptica aplicada o de percepción visual). El otro tiene un enfoque biomédico y contribuye al conocimiento necesario de los aspectos generales de las líneas de investigación biomédicas (es decir, inmunología ocular o cirugía refractiva y calidad de vida). También se ofertan 5 cursos de naturaleza metodológica (diseñados para alcanzar el conocimiento y las capacidades necesarias en las técnicas de investigación), incluyendo el curso de "Elementos básicos de la investigación científica", que forma al alumno en las capacidades básicas que necesitará usar para el desarrollo de cualquier proyecto de investigación (los procedimientos éticos, la buenas prácticas de laboratorio, la búsqueda bibliográfica, las técnicas estadísticas y la preparación de artículos científicos).

Hay 14 alumnos matriculados y se leen una media de 4 tesis por curso.

Investigación

No quisiera concluir esta charla sin daros unas pinceladas de la investigación que está realizando uno de los grupos. Y he seleccionado deliberadamente el de superficie ocular. Porque como de eso sé muy poco, seguro que no hablaré mucho.

En estos momentos trabajan en un vasto proyecto que pretende la reconstrucción de la superficie ocular.

La superficie ocular es un concepto acuñado a finales de la década de 1970 y que expresa la existencia de una unidad integral fisiopatológica, compuesta por los tejidos que están en contacto con el medio ambiente, que comprende, además, una compleja red neuroendocrina y cuya misión fundamental es la de garantizar la transparencia de la córnea. Cualquier alteración en esta unidad puede provocar la ceguera por pérdida de transparencia corneal.

Hasta la década de 1990 el único recurso para reparar estos problemas eran los trasplantes de córnea, que aunque obtienen muy buenos resultados en muchos casos, en otros fracasan, básicamente porque se realizaban sin conocer el estado de las células madre del epitelio corneal que se encuentran en el limbo.

Nació así otro concepto importante: el síndrome de insuficiencia límbica, derivado de la ausencia de las células madre.

Puede parecer que esto es una cosa muy rara, y si observamos los síndromes primarios (aniridias, deficiencias endocrinas múltiples, eritroqueratodermia congénita) aparentemente es así. Pero si miramos a los secundarios (causticacio-

nes, irradiación, portadores de lentes de contacto, yatrogénicos, inflamaciones crónicas de la conjuntiva, uso crónico de medicación tópica y otros) el panorama es muy distinto.

Hasta ahora las posibles soluciones, todas quirúrgicas, son: el ya mencionado trasplante de córnea, el de limbo, el de membrana amniótica y el de conjuntiva. Todos ellos tienen un serio inconveniente, hay que realizarlos en "caliente" y el lecho receptor es "hostil", por lo que tras un aparente éxito inicial muchos fracasan a corto plazo.

Con estas ideas, el grupo de superficie ocular ha abordado la situación mediante un proyecto encuadrado en la denominada bioingeniería de tejidos.

Pretenden desarrollar un biopolímero que actúe de soporte o matriz celular y poblar este polímero con células epiteliales (finalmente células madre) capaces de reconstruir el tejido corneal dañado.

Para evitar que la inflamación estropee el trasplante quieren seleccionar los fármacos más efectivos y menos tóxicos creando, para probarlos, un modelo *in vitro* de inflamación de la superficie ocular.

Hasta ahora se ha conseguido hacer cultivos primarios de conjuntiva y estimular a esas células para que reaccionen en un entorno inflamatorio.

Como fruto de estos experimentos se ha logrado una línea celular estable (inmortalizada) que se ha registrado con el nombre de IOBA-NHC (Normal Human Conjuntiva) y que está siendo cedida a numerosos grupos de investigación de todo el mundo.

Además, por técnicas de ingeniería genética se ha fabricado un polímero basado en elastina y nuestros expertos trabajan en la modificación de sus propiedades para mejorar la adherencia celular y disminuir los efectos de la inflamación.

Gracias a este proyecto, algunos oftalmólogos se han familiarizado con técnicas como la inmunohistoquímica, la citometría de flujo, o el western-blot, y biólogos, bioquímicos y físicos están aprendiendo a trabajar con nosotros.

Lo más importante de todo es que estoy seguro de que nuestros pacientes se sienten muy orgullosos de ser atendidos por clínicos que destinan muchas horas de su tiempo a buscar nuevas soluciones para sus problemas.

DISCUSIÓN

F. ARNALICH: Le agradezco que haya hecho el esfuerzo de venir a esta conferencia. Estoy bastante sorprendido con lo que han conseguido con su trabajo en pocos años. Creo que la oftalmología está muy desaprovechada en cuanto a investigación. A pesar de que es una especialidad que tiene un desarrollo espectacular en el ámbito quirúrgico, de técnicas de imagen, etc., en investigación también tiene un gran potencial. Creo que es la patología que más implica a la sociedad. Todo el mundo tiene problemas de superficie ocular, un 10%, como usted sostiene, tiene ojo seco, todos van a sufrir problemas del cristalino, como presbicia o catarata. Cifras similares presentan degeneración macular asociada a la edad en la retina. O sea, que es una patología muy frecuente con niveles básicos de biología básica. Tratamos neuronas, tratamos receptores, células bipolares, fotorreceptores, partes del sistema nervioso central, músculo, etc. Aun así, es una especialidad muy desaprovechada en cuanto a investigación. No sé por qué no se ha investigado más en este campo, porque, además, se trata de una especialidad con muy poca competencia si la comparamos con otras especialidades como la cardiología o la neurología. Y el terreno a explorar es enorme.

J.C. PASTOR: No hay grupos de investigación en oftalmología en Cataluña, y esto debería hacerlos reflexionar a todos. La gente prefiere ganar dinero. Y es que se gana mucho. En una clínica de cirugía refractiva, por ejemplo, ofrecen a un residente recién terminado sueldos del orden de 70 u 80.000 € anuales más incentivos. En cambio, la línea que nosotros hemos elegido es muy dura. Ahora podemos ofrecer algunos resultados, después de 15 años de trabajo. Tenemos un gran problema en la oftalmología española: nuestro prestigio internacional como clínicos. En el mundo se conoce a la oftalmología española por las "viejas" glorias, pero vivimos de las rentas, de los buenos cirujanos que tuvimos en el siglo pasado. Nuestra idea es abrir el Instituto a cualquier idea de cualquier persona de España que quiera colaborar con nosotros.

D. HERREROS: ¿Cómo aíslan las células madre del limbo?

J.C. PASTOR: De hecho, yo me dedico esencialmente a la retina, a la reparación de la interfase retinovitrea, a la inflamación crónica intraocular, a sus efectos sobre neuronas, etc. Por eso mi

respuesta puede no ser científicamente muy precisa. De momento, todavía estamos identificando estas células, o sea, que todavía no están aisladas. Lo que hacemos en estos momentos los clínicos es trasplantar el limbo, suponiendo que en el limbo están las células madre. Nuestra idea es identificarlas, hacerlas crecer sobre un polímero, poder modificarlas y trasplantar ese complejo de biopolímero con las células. Para más información: calonge@loba.met.uva.es

J.R. MORANDEIRA: A mí me parece que todo el que ha intentado realizar algo de investigación en este país, sobre todo si es fuera de Madrid y Barcelona, donde se concentra el 80% de los recursos, es, de alguna manera, un pequeño héroe. Creo que es un muy buen ejemplo. Mi

pregunta es: ¿contáis con recursos del Insalud o de la Seguridad Social?

J.C. PASTOR: Ya quisiéramos que el Servicio Castellano-Leonés de Salud adoptara nuestro Instituto como centro de referencia. Espero que en los próximos 10 o 15 años se den cuenta de que esto es posible. De momento, la iniciativa es pura y exclusivamente universitaria.

J.R. MORANDEIRA: En estos momentos, la sanidad española está totalmente politizada. Debemos ir a un sistema más europeo. A lo mejor a nosotros no nos toca disfrutarlo, pero no debemos ser derrotistas y animar a la gente joven, porque seguro que el futuro va a ser mejor que el que hemos tenido nosotros.

Investigación en cáncer colorrectal: visión del cirujano

D. García-Olmo* y D.C. García-Olmo**

*Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

**Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario y Universitario de Albacete.

Biología molecular del cáncer colorrectal humano

La biología molecular del cáncer colorrectal (CCR) abarca una amplísima variedad de aspectos que van desde la carcinogénesis del tumor y su diseminación hasta la aplicación de los conocimientos moleculares al tratamiento de esta neoplasia.

Hasta el momento se han descrito dos rutas moleculares para el origen del cáncer (fig. 1): vía supresora (cánceres de fenotipo supresor) y vía mutadora (cánceres de fenotipo mutador).

Vía supresora

Es de sobra conocida la teoría de las etapas múltiples del desarrollo del tumor, desde el pólipo hasta el cáncer invasivo, debido a la acumulación de alteraciones genéticas, metilaciones, mutaciones, deleciones, que se inician en la mutación del gen APC (*adenomatous polyposis coli*) de la poliposis múltiple familiar, como se observa en el siguiente esquema:

Mutación o deleción del APC (5q)
⇒ Poliposis adenomatosa

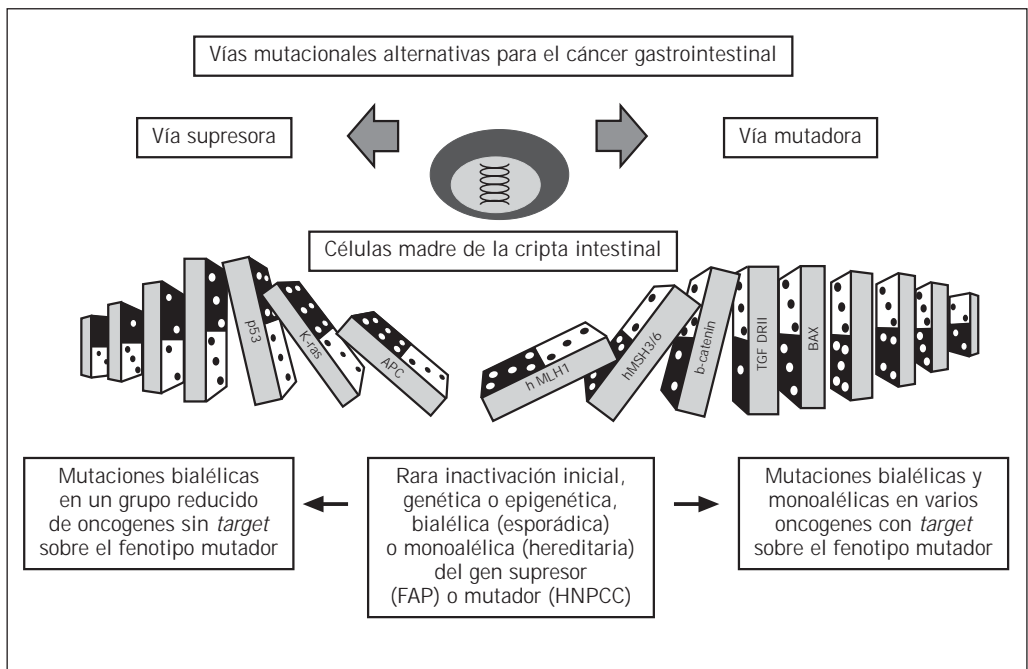


Fig. 1. Representación esquemática de las dos vías de origen del cáncer colorrectal: vía supresora y vía mutadora.

APC+ Mutación puntual de *k-ras* ⇒ Estadios tempranos de la transición adenoma-carcinoma

APC+*k-ras*+ Deleción en el carcinoma colorrectal (DCC) (18q) ⇒ Carcinoma
APC+*k-ras*+ DCC+ Mutación o deleción de p53 (17p) ⇒ Estadios finales

Todo este proceso secuencial resulta en inestabilidad cromosómica. A pesar de que este esquema de alteraciones consecutivas de oncogenes y genes supresores ha sido aceptado durante muchos años, ahora puede cuestionarse alguno de sus aspectos; por ejemplo, la transición adenoma-adenocarcinoma.

Un gen de gran importancia clínica es el oncogén *k-ras*. Las mutaciones de este oncogén estimulador del crecimiento son de relevante importancia en el desarrollo del carácter invasivo del CCR e imprimen, además, distintos grados de agresividad al tumor, a los que se ha atribuido valor pronóstico.

Vía mutadora

Los tumores de "fenotipo mutador" se caracterizan por tener alterados genes reparadores del ácido desoxirribonucleico (ADN), como el hMSH2 o hMLH1. La alteración de estos genes se traduce en errores en la replicación del ADN, que dan lugar a deleciones e inserciones, y que habitualmente se detectan mediante análisis de inestabilidad de microsatélites.

La primera patología en la que se identificó esta etiología fue el CCR hereditario no polipósico o síndrome de Lynch. Éste es uno de los desórdenes hereditarios más frecuentes en la predisposición al cáncer de colon, pero, también, uno de los de mayor tiempo de supervivencia. Sigue una herencia autosómica dominante y constituye el 5-13% de los CCR.

Ácidos nucleicos tumorales circulantes en plasma y suero y cáncer colorrectal

La presencia de ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico [ADN] y ácido ribonucleico [ARN]) circulantes en el plasma de pacientes con cáncer fue ya puesta en evidencia en la década de 1970, pero no fue hasta 1989 cuando se identificó su carácter tumoral¹. Desde entonces, y especialmente en los últimos 7 años, este fenómeno ha cobrado un especial interés, dando lugar a numerosos estudios que, fundamentalmente, han confirmado este hecho y han intentado asociarle valores diagnósticos, pronósticos y de utilidad para la monitorización del pro-

ceso canceroso, especialmente tras la aplicación de terapias²⁻⁷.

Son muchos los tipos de cáncer que han sido objeto de estos estudios y sus resultados, valorados en conjunto, sugieren que la presencia en sangre de ácidos nucleicos tumorales libres (no asociados a células) es un hecho común a todos ellos.

La mayor parte de estos trabajos se han centrado en el estudio del ADN; así, por ejemplo, se ha comunicado la detección de ADN tumoral plasmático en pacientes de CCR³, pancreático⁸, pulmonar¹, de mama⁷, en pacientes con linfomas foliculares¹, etc. En general, las alteraciones genéticas que se detectan en el ADN plasmático de estos pacientes son las mismas que están presentes en el tumor primario: mutaciones en oncogenes, inestabilidad de microsatélites, translocaciones cromosómicas, alteraciones epigenéticas o incluso ADN vírico¹.

Así pues, no parece quedar ya duda alguna de que los pacientes de cáncer presentan una mayor presencia de ADN libre circulante que los voluntarios sanos y que, en la gran mayoría de los casos, se encuentran alteraciones genéticas idénticas a las del tumor primario. Además, como ya se ha comentado, en muchos de estos casos se ha asociado un valor diagnóstico y pronóstico a este fenómeno, llegando incluso a recomendar este tipo de análisis como métodos de cribado y detección precoz de procesos neoplásicos³.

Enigmático origen de los ácidos nucleicos libres circulantes en sangre

En sujetos sanos, el ADN plasmático parece ser derivado de linfocitos y otras células nucleadas⁹ y en cancerosos no hay duda de que una parte sustancial del ADN libre circulante deriva de las células tumorales, pero los mecanismos de liberación siguen siendo desconocidos.

Existe una controversia acerca de la naturaleza del ADN tumoral circulante: algunos estudios apuntan hacia una liberación, fruto de procesos de muerte celular (necrosis y/o apoptosis)¹⁰ y otros no descartan la posibilidad de un mecanismo de liberación activa¹¹. Lo cierto es que ningún estudio ha mostrado datos suficientes para determinar la relación entre muerte celular, liberación activa y presencia de ADN tumoral en el plasma. Sin embargo, al revisar la bibliografía, encontramos que la conclusión más adecuada a nuestro juicio es la de Anker et al: "La presencia de ADN tumoral en el plasma es, probablemente, el resultado de diferentes mecanismos, en diferente proporción, que dan lugar a liberación o excreción de ADN"¹¹.

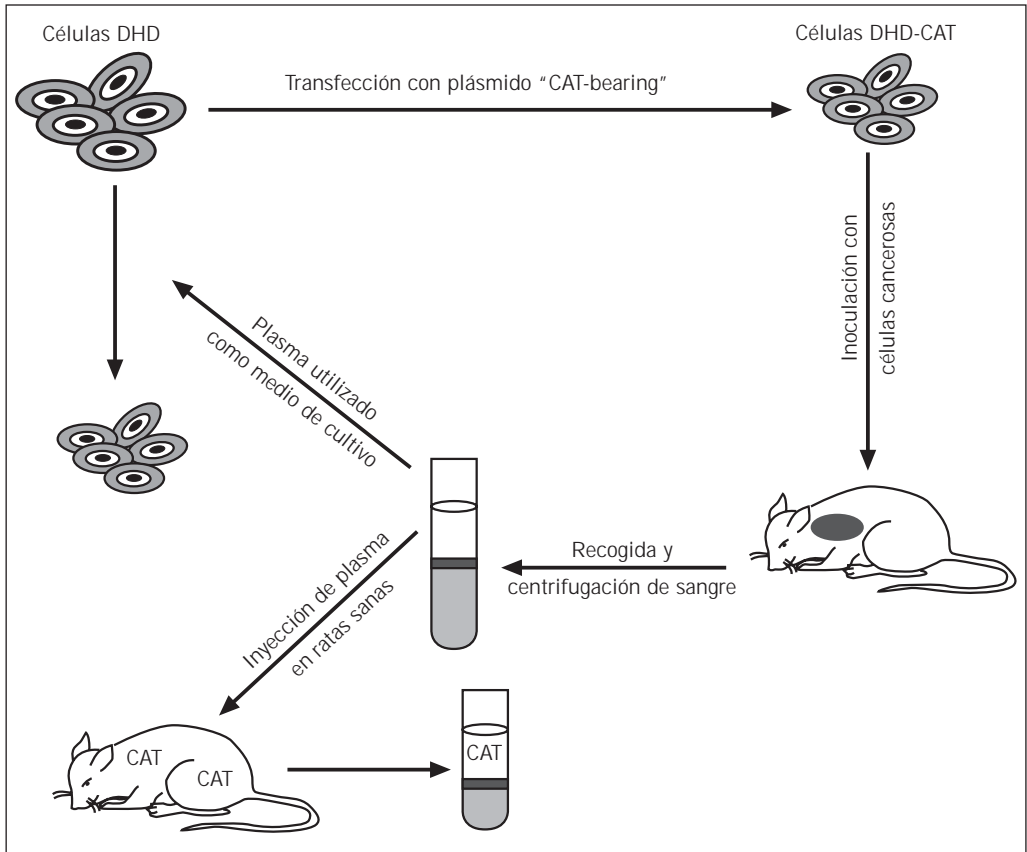


Fig. 2. Representación esquemática de los ensayos de transfección de células en cultivo a partir de plasma de ratas cancerosas¹²⁻¹⁴.

Posible "rol" de los ácidos nucleicos plasmáticos en la progresión tumoral y en el desarrollo de metástasis

Cualquiera que sea el origen de los ácidos nucleicos tumorales presentes en el plasma de los pacientes de cáncer, hay muchos indicios que llevan a plantearnos que su presencia puede no ser fortuita, sino que pueda tener alguna relación con la progresión de la enfermedad cancerosa.

Estos indicios son hechos demostrados, como la constante presencia de elevadas cantidades de ácidos nucleicos tumorales en el plasma y suero de pacientes de cáncer y la evidencia de que estas secuencias tienen integridad suficiente para ser amplificadas y circular protegidas de la degradación. Además, los resultados que nos

han ido ofreciendo los últimos estudios experimentales de nuestro grupo hacen pensar en que la idea de que los ácidos nucleicos plasmáticos tengan actividad biológica no es descabellada.

En 1999, nuestro grupo mostró, mediante un modelo de cáncer de colon en la rata, que el plasma de las ratas cancerosas era capaz de transformar de forma estable células en cultivo, lo que se manifestó tanto en su genotipo como en su fenotipo^{12,13} (fig. 2). Esto nos llevó a proponer la denominada "hipótesis de las genometástasis", según la cual puede existir un mecanismo alternativo en el desarrollo de metástasis mediado por la transfección de células sensibles, localizadas en órganos distantes, con secuencias genéticas procedentes del tumor primario y que circulan libres en la sangre¹²⁻¹⁴. Así mismo, ex-

perimentos en curso en los que empleamos plasma de pacientes de cáncer están dando resultados afines.

Como un posible mecanismo para explicar este proceso, propusimos el descrito por Holmgren et al¹⁵, quienes demostraron que el ADN de cuerpos apoptóticos era transferido al núcleo de células fagocíticas y esta transferencia era estable en el tiempo. Más aún, en un estudio posterior del mismo grupo¹⁶ se sugirió que la transferencia lateral de ADN entre células eucariotas podía resultar en aneuploidía y acumulación de cambios genéticos necesarios para la formación tumoral. Si éste puede ser un mecanismo de crecimiento tumoral, ¿por qué no de diseminación del cáncer a órganos distantes?

Por tanto, enlazando nuestra hipótesis con estos hallazgos, podríamos pensar que los ácidos nucleicos tumorales libres, envueltos en estructuras suficientes para protegerlos de la degradación sérica –como los cuerpos apoptóticos–, pueden circular en sangre y ser transferidos a otras células de forma estable, lo que resultaría en la malignización de éstas y en la formación de metástasis.

Esta idea es también coherente con el estudio de otros autores, cuyos resultados les hacen concluir que el ARN plasmático puede circular dentro de partículas, como los cuerpos apoptóticos, lo que le protegería de la degradación¹⁷. Además, el hecho de que circulen protegidos en estructuras membranosas podría dar una explicación a lo que se ha denominado “afinidad de las células tumorales a determinados órganos”, donde desarrollan metástasis.

Estos hallazgos, calificados como “emocionantes” por algunos investigadores¹, siguen llevando a la necesidad de profundizar en estos fenómenos que pueden ser de gran importancia en la fisiopatología del cáncer.

Uno de los aspectos sobre los que parece necesario profundizar es la naturaleza de las células que se malignizan en órganos distantes. En el enunciado de la “hipótesis de las genométastasis” también planteamos la cuestión de qué células distantes al tumor primario podrían ser capaces de ser transfectadas y malignizarse^{13,14}. Las células madre han sido frecuentemente propuestas como el origen de la carcinogénesis, por tanto, podría ser interesante ampliar esta propuesta al proceso de metastatización.

En resumen, el origen y función de los ácidos nucleicos tumorales circulantes es aún oscuro, pero muchos indicios apuntan hacia la necesidad de profundizar en este fenómeno, por la posibilidad de su implicación en el proceso metastático.

BIBLIOGRAFÍA

1. Johnson PJ, Lo YMD. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin Chem* 2002;48:1186-93.
2. Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:1961-5.
3. Kopreski MS, Benko F, Borys DJ, Khan A, McGarrity TJ, Gocke CD. Somatic mutation screening: identification of individuals harbouring k-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Nat Cancer Inst* 2000;92:918-23.
4. Dasí F, Lledó S, García-Granero E, Ripoll R, Marugán M, Tormo M, García-Conde J, Aliño SF. Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest* 2001;81:767-9.
5. Silva JM, Domínguez G, Silva J, García JM, Sánchez A, Rodríguez O, et al. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 2001;7:2821-5.
6. Silva JM, Rodríguez R, García JM, Muñoz C, Silva J, Domínguez G, et al. Detection of epithelial tumor RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumor cells. *Gut* 2002;50:530-4.
7. Silva JM, Silva J, Sánchez A, García JM, Domínguez G, Provencio M, et al. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. *Clin Cancer Res* 2002;8:3761-6.
8. Sorenson GD. Detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2129-37.
9. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann NY Acad Sci* 2000;906:161-8.
10. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayr FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61:1659-65.
11. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumor DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:65-73.
12. García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E, Vallejo M. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genométastasis. *Histol Histopathol* 1999;14:1159-64.
13. García-Olmo D, García-Olmo DC. Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genométastasis. *Ann NY Acad Sci* 2001;945:265-75.
14. García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E. Horizontal transfer of DNA and the “genométastasis hypothesis”. *Blood* 2000;95:724-5.

15. Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 1999; 93:3956-63.
16. Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, et al. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6407-11.
17. Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem* 2001;47:1488-9.

DISCUSIÓN

J. FORTEA: Sobre la hipótesis de la genometástasis, ¿cómo se justificaría la presencia de los genes supresores de tumores en una metástasis hepática?

D. GARCÍA-OLMO: Hay una gran discusión al respecto. Yo he hablado de ADN, pero también hay grandes cantidades de ARN mensajero en partículas denominadas exosomas o incluso en liposomas en el plasma de los pacientes con cáncer. El caso es que el CCR y sus metástasis no son genéticamente idénticos. Esto es algo que está quedando claro actualmente. Una de las explicaciones es que los clones emigren. Los tumores son heterogéneos. No son solamente un clon tumoral. Entonces, hay muchos clones y una explicación para esa heterogeneidad de la metástasis con respecto al tumor original sería que sólo los clones que pueden viajar viajen. Si aceptáramos esta hipótesis, realmente la explicación sería que para que ocurra el cambio fenotípico de la *stem cell*, de la célula pluripotencial del hígado o del pulmón tienen que ocurrir una serie de acontecimientos y producirse cooperación oncogénica. ¿Cuántos acontecimientos han de ocurrir? Es azar. Ocurren algunos acontecimientos y lo demás lo desarrolla la propia célula. En el estudio de oncogenes circulantes se observa que los hay de todas clases y en una gran cantidad. Ya se puede decir que hay una correlación bastante buena entre la clínica y la cantidad de ADN circulante y, sobre todo, de algunos marcadores oncogénicos. En el cáncer de mama, por ejemplo, existe una excelente correlación. Cuanto más ARN mensajero hay en la sangre, más maligno es el tumor y peor pronóstico tiene la paciente. El mundo del ADN circulante y su posible papel biológico es hoy día interesantísimo.

V. ALFARO: Habéis medido el ADN circulante en fracción libre en plasma. ¿Cómo se incorporaría este ADN circulante al núcleo celular?

D. GARCÍA-OLMO: Ese es el problema fundamental. ¿Cómo se hace? ¿Se integra? ¿No se integra?

¿Se integra de forma heteróloga? Es muy difícil de saber y nadie lo ha demostrado. Lo que sí está claro es que el ADN se expresa. Probablemente la clave no sea tanto el ADN sino el ARN. Lo que ocurre es que el ARN aguanta muy pocos milisegundos en la sangre, tiene muy poca actividad biológica si no va recubierto. ¿De qué puede ir recubierto? De vesículas apoptóticas, exosomas, liposomas, restos de membrana. Ahora mismo nos encontramos en esta discusión.

V. ALFARO: ¿Se ha observado esto en otros modelos, como el cáncer de mama, que también es muy metastásico?

D. GARCÍA-OLMO: Muchos grupos están estudiando el posible valor pronóstico del ARN y del ADN en la sangre de pacientes tumorales. En España, por ejemplo, tenemos un grupo muy activo en la Clínica Puerta de Hierro del Dr. Bonilla trabajando con concentraciones de ARN y ADN en pacientes con cáncer de mama y sus trabajos son espectaculares en relación con la buena relación clínica que existe. La gran pregunta se refiere a la actividad biológica: ¿Esto es biológicamente activo o simplemente es un desecho? Es difícil de creer que sea un desecho si nos fijamos en que los oncogenes se descubrieron cogiendo extractos tumorales y cultivando fibroblastos de NIH/3T3. Se observó que eran biológicamente activos porque transformaban el NIH/3T3 en tumores implantables. Por tanto, realmente los restos celulares, los restos de una necrosis, de una lesión celular tienen actividad biológica y, si están circulando por la sangre, por lo menos debemos preguntarnos si tienen actividad biológica. Es muy importante afirmar que estamos hablando de una hipótesis que hay que investigar y en la que hay que profundizar.

S. ERILL: Una posible manera de hacer una profilaxis en el momento de la intervención sería utilizar medicamentos que se intercalan con el ADN. La eficacia de distintos fármacos en el

cáncer de colon se ha establecido en función del cáncer de colon en la clínica. Un intercalador con el ADN a una dosis, por elevada que fuera, no tendría problemas de toxicidad y podría ayudar.

D. GARCÍA-OLMO: Aunque la imaginación nos podría conducir en esta dirección, uno tiene que frenarse. Igual que utilizamos profilaxis antibiótica durante la cirugía, ¿por qué no podríamos hacer lo mismo con ADNsas, por ejemplo? Sin embargo, en algunas catas experimentales que hemos realizado, no ha demostrado ser tan eficaz. Pero también se han dado algunos casos de eficacia muy llamativa. Por ejemplo, hemos visto que trabajando con ADNsas o utilizando algunos tipos de ADNsas hemos disminuido el número de metástasis hepáticas. Pero pueden ser artificios de laboratorio, ya que es demasiado complicado. Probablemente el ADN libre no sea la causa. Es posible que vaya en membranas o vaya en vesículas, y esto no lo podemos atacar con ADNsas. No será fácil pero puede ser un camino.

M. BARRIOS: ¿Habéis medido la cantidad de ADN y su correlación con la actividad metastásica?

D. GARCÍA-OLMO: Nosotros no, porque no es nuestra área de interés, pero muchos autores lo han hecho desde el año 1973. Hay bastante buena correlación, en algunos cánceres más que en otros. En el cáncer de mama, por ejemplo, la correlación es muy buena y en cambio en el CCR es más deficiente. Lo que está claro es que hay un nivel de ADN en un paciente normal que se duplica si tiene una enfermedad benigna pero no invasiva, que se triplica si la enfermedad es invasiva y nos encontramos ante un cáncer y que prácticamente se cuadruplica si tiene metástasis hepática leve.

D. GARCÍA-DORADO: Mi pregunta es colateral y a lo mejor no está directamente relacionada con la cirugía. Durante la quimioterapia se produce muerte celular por apoptosis. ¿Existen estudios que hayan investigado este campo en el contexto de la quimioterapia?

D. GARCÍA-OLMO: Donde hay más cuerpos apoptóticos y más nivel de ADN circulante es en los pacientes con quimioterapia y radioterapia. Es decir, los pacientes, durante el efecto de la quimioterapia y la radioterapia, tienen una gran cantidad de apoptosis, pero sobre todo de necrosis celular. A nuestro juicio, el camino de la

necrosis celular es pero desde el punto de vista de la actividad biológica, en la que quedan los restos, que el camino de la apoptosis. La pregunta es por qué no se producen más metástasis en este sentido. Nuestra hipótesis parte de que actuarían sobre las células multipotenciales o pluripotenciales que hay en los distintos órganos diana. ¿Por qué pueden estas células adquirir estos cambios fenotípicos? Porque se reproducen a mucha velocidad. Si la quimioterapia les frena la velocidad de reproducción, la posibilidad de que adquieran un cambio fenotípico es mucho menor.

Algunos investigadores han observado que cuando se utilizaba solamente radioterapia en el cáncer de recto tenían menos número de residuos locales y más número de metástasis a distancia. Ésta es una de las causas por las que se utiliza sistemáticamente quimioterapia y radioterapia asociadas en el CCR y, sobre todo, en el recto.

Y. ÁLVAREZ: Has mostrado una gráfica en la que por orden de tiempo se observaba primero metástasis en el pulmón, luego en el hígado y después en la sangre. ¿No debería ser al contrario: primero en la sangre, después en el hígado y finalmente en el pulmón?

D. GARCÍA-OLMO: En este trabajo nosotros deseábamos el plasma y los glóbulos rojos y nos quedábamos solamente con las células nucleadas. Mirábamos en el *buffy coat*. Lo que observábamos era marca tumoral, el gen CAT, y no las células. Lo que estaba transfiriendo la marca tumoral no eran las células, sino el plasma. Seguíamos el camino de todos los investigadores, que era buscar las marcas tumorales en el *buffy coat*. Es una metodología absolutamente al uso y habitual en el laboratorio. Cuando vislumbramos otro camino, entonces preferimos cambiar de dirección y plantearnos nuevas cuestiones en nuestra investigación.

F. SORIGUER: ¿Quiere decir que la idea de metástasis tal y como existía se ha quedado obsoleta y deberíamos hablar de paraclonación o algo parecido?

D. GARCÍA-OLMO: Desde el año 2002 hasta ahora estamos en plena revolución del concepto del cáncer. Por ejemplo, desde el momento en que Catherine Verfaillie descubrió que en la médula ósea humana había células pluripotenciales, o desde el nuevo concepto de la homeostasis de los tejidos, en que cada uno de los tejidos tiene

una dotación de células madre pluripotenciales de las que depende la regeneración y que escasamente las células diferenciadas van a sustituir o reparar lo que ocurra. Es decir, el concepto que teníamos antes de hepatitis ha cambiado. Son las células o la dotación en células madre que tiene cada órgano la que reconstituye y reconstruye el órgano. Además, la bibliografía al respecto está en ebullición. Si leemos *Science* o *Cell*, comprobamos

que el concepto *cancer-cell/stem-cell* se está consolidando. Hoy día todo el mundo piensa que un hepatocarcinoma no nace de un hepatocito, sino que nace de la célula madre pluripotencial de dotación del hígado, y así es el concepto del cáncer. Un editorial de *Cell* de finales de 2002 nos hizo darnos cuenta de que estaban cambiando los conceptos, no sólo de homeostasis de los tejidos sino también del concepto del cáncer.

Investigación en un entorno como la Corporació Parc Taulí

Ll. Blanch Torra y M. Dalmases

Corporació Parc Taulí, Instituto Universitario FPT-UAB, Sabadell.

Introducción

Tradicionalmente muchas instituciones consideradas no universitarias tienen dificultades para realizar investigación, ya que son consideradas como centros orientados únicamente a atender enfermos y en la que se prioriza como actividad del valor añadido la formación de buenos clínicos. Además, la falta de recursos específicos y de identidad universitaria hace que sólo grupos muy seleccionados desarrollen proyectos de investigación. Sin embargo, no hay que olvidar que las bases científicas de la medicina son iguales para todos, y cada vez más los profesionales de la salud las conocen y, por tanto, tienen más inquietudes. Por tanto, es lícito y viable plantear objetivos de investigación en cualquier institución, siempre de acuerdo al conocimiento, aptitudes y recursos disponibles.

La distinción entre investigación avanzada de elevado presupuesto que debe obligatoriamente restringirse a unos determinados centros, que darán servicio, colaboración y respuestas a otros, y la investigación clínica, fisiológica, epidemiológica, la mayoría realizada a pie de cama, está al alcance de muchos centros, lo que resulta en un beneficio para el enfermo, el profesional y en definitiva aporta calidad a la atención médica que se presta a la sociedad. Finalmente, el deseo de ver plasmado en realidad terapéutica eficaz los resultados de un proyecto de investigación es un estímulo al alcance de muchos profesionales.

Investigación orientada al paciente

El National Institute of Health define este tipo de investigación como aquella que requiere un contacto con el paciente, o con los sujetos humanos o con tejidos o materiales de origen humano. De hecho, se trata de diferentes aproximaciones que integran cómo los componentes moleculares interaccionan con los sistemas fisiológicos en el contexto de un sujeto o paciente.

Investigación traslacional

La investigación traslacional aplica descubrimientos derivados de las ciencias básicas para el desarrollo o para el entendimiento de mecanismos implicados en las enfermedades, para la mejora de métodos diagnósticos o para la aplicación de tratamientos más eficaces. La observación clínica y los estudios fisiológicos a pie de cama permiten a su vez plantear preguntas que sólo van a tener respuesta, con el consiguiente beneficio en el avance del conocimiento, reiniciando el ciclo de investigación traslacional.

Investigación orientada a innovación

Más allá de la contribución al conocimiento y al desarrollo de terapéuticas, la investigación puede favorecer la innovación tecnológica en el ámbito de la salud, no exenta de estar sujeta a leyes comerciales o propias de mercado, y, por tanto, a favorecer inversión y explotación comercial posterior para beneficio de instituciones e individuos.

Investigación en la Corporació Parc Taulí

La Corporació Parc Taulí tiene como misión y valores impulsar, favorecer y divulgar los trabajos de investigación y docencia de sus profesionales de acuerdo con las aptitudes y recursos disponibles. Todo ello en colaboración con otras instituciones, con la finalidad de que sea un valor añadido para el paciente y por añadidura para sus profesionales. A este fin, la Corporació Parc Taulí creó la Fundació Parc Taulí como ente vehiculizador de estas iniciativas, y en el año 2001 recibió el reconocimiento de Instituto Universitario adscrito a la Universidad Autónoma de Barcelona.

El Comité Institucional de Investigación de la Corporació Parc Taulí define y dirige las políticas de investigación, definiéndose así cuatro líneas de investigación: básica, clínica, operativa y en sa-

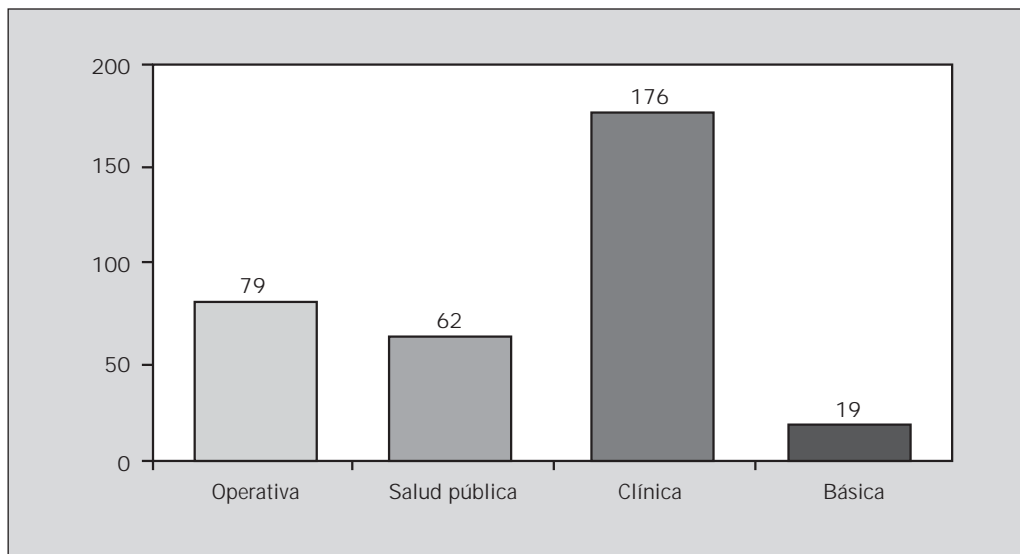


Fig. 1. Número de proyectos por cada tipología de investigación de la Corporació Parc Taulí durante los años 2000-2002.

lud pública. En la figura 1 se observan el número de proyectos por cada tipología de investigación durante los años 2000-2002. En la figura 2 se muestra el impacto de la investigación de la Corporació Parc Taulí en la comunidad científica durante los años 2000-2002.

De estos resultados se deduce la importancia de la investigación clínica y, en menor proporción, de la investigación básica y traslacional.

Cabe destacar la participación de grupos consolidados de la Corporació Parc Taulí en redes nacionales de centros:

1. Red Nacional de Investigación en Hepatología y Gastroenterología. Fisiopatología y nuevas formas de tratamiento de las enfermedades hepáticas, gástricas y pancreáticas (RNIHG).

2. Estrategias para las políticas de antibióticos, control de resistencias microbianas para el tratamiento de infecciones complejas. Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI).

Y en redes de grupos:

1. Insuficiencia respiratoria aguda grave. Lesión pulmonar aguda (Red GIRA).

2. Estudio cooperativo en retraso mental de origen genético.

3. Plataforma de genotipación para la identificación de factores genéticos implicados en la

susceptibilidad y en la respuesta farmacológica de las enfermedades mentales. Red de genotipación y psiquiatría genética.

4. Investigación en servicios sanitarios para la toma de decisiones en el sistema nacional. Aplicación práctica a las listas de espera. Investigación en resultados de salud y servicios sanitarios (Red IRIS).

5. Defectos metabólicos y moleculares en la diabetes mellitus y sus complicaciones en la terapia génica y celular.

Finalmente cabe destacar la participación de la Corporació Parc Taulí en el proyecto de un Centro de Innovación en Nuevas Tecnologías Aplicadas a la Medicina en el contexto del Parc de Salut. Ambos proyectos están impulsados por la propia Corporació y el Ayuntamiento de Sabadell, a fin de investigar y aportar productos o servicios basados en nuevas tecnologías aplicadas a la salud a partir de la colaboración y trabajo interdisciplinario de clínicos investigadores, tecnólogos, universidades y empresas.

Barreras para la investigación en el entorno hospitalario

Las dificultades para realizar proyectos de investigación en el entorno hospitalario podrían identificarse en los siguientes puntos:

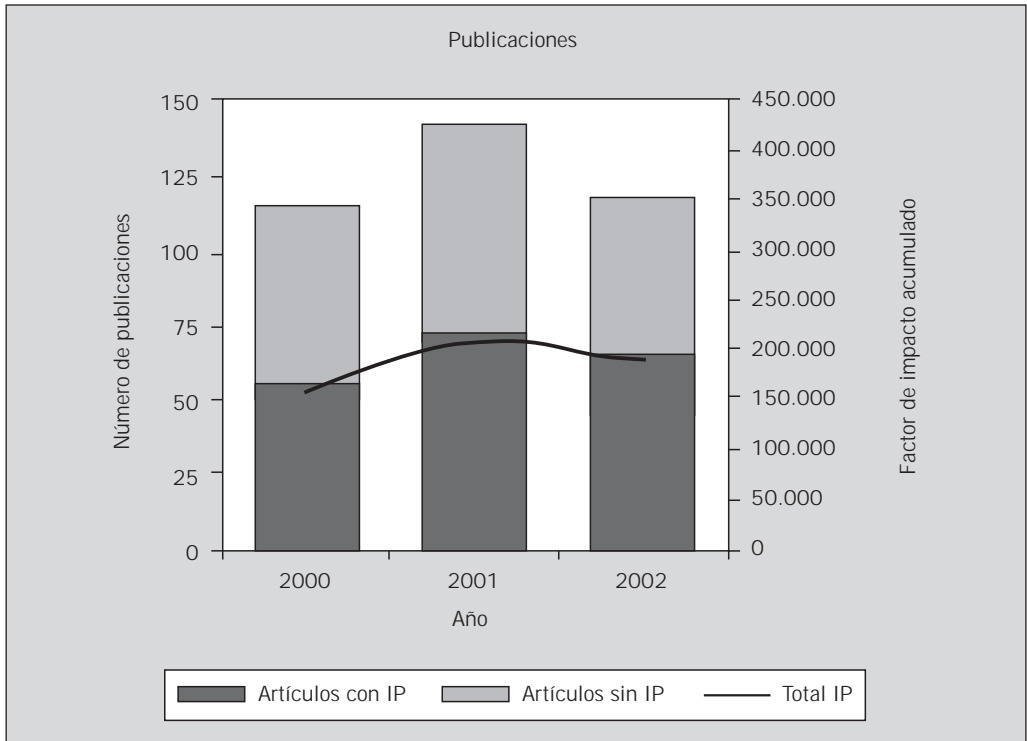


Fig. 2. Impacto de la investigación de la Corporació Parc Taulí en la comunidad científica durante los años 2000-2002.

1. Imposibilidad para un solo individuo de llevar a cabo todo lo relacionado con la investigación.

2. Necesidad de establecer una estrecha colaboración entre centros de investigaciones básicas y los investigadores clínicos.

3. Presión creciente (también llamada producción) para dedicar más tiempo a realizar actividad asistencial (necesidades sociales obvias y en aumento) sin incremento proporcionado de recursos humanos.

4. Limitación de los fondos públicos destinados a investigación orientada al paciente.

5. Dificultad para el establecimiento de carreras profesionales orientadas a investigación, incluso en centros académicos.

Retos de futuro para fomentar la investigación en el entorno hospitalario

Incrementar los logros en investigación debe ser el objetivo de cualquier institución sanitaria. Estos logros deben estar en consonancia con la

misión y estrategia de cada institución y siempre ayudándose del enorme valor añadido que las alianzas entre centros que van a colaborar entre sí deben aportar. Por tanto, y común a todas las instituciones, los retos para incrementar una investigación de calidad van a ser:

1. Motivar y atraer profesionales bien formados y con capacidad de liderazgo.

2. Diseñar planes de formación en metodología científica como complemento a la educación clásica y a la práctica clínica diaria.

3. Conocer y potenciar el uso de nuevas tecnologías de forma individual o compartida.

4. Diseñar formas de colaboración entre centros del sector público y otros mayoritariamente de capital privado, como farmaindustria y empresas de bioingeniería, biomateriales, robótica, etc.

5. Establecer, definir y apoyar líneas prioritarias de investigación de acuerdo con los problemas específicos de cada institución.

6. Participar, abierta y decididamente, en las redes, institutos o alianzas de investigación más idóneas y que cuenten a su vez con el apoyo de la administración.

BIBLIOGRAFÍA

- Bigorra J. Tendencias en I+D farmacéutica. Barcelona: Novartis Farmacéutica S.A., 2004.
- Blanch L. Reflexions al voltant d'una trajectòria. *Ann Med* 2002;85:225-7.
- Bloom FE. Science as a way of life: perplexities of a physician-scientist. *Science* 2003;300:1680-5.
- Brochard L, Mancebo J, Tobin M. Searching for evidence: don't forget the foundations. *Intensive Care Med* 2003;29:2109-11.
- Fontanarosa PB, DeAngelis CD. Translational research. *JAMA* 2003;289:2133.
- Grunberg SM, Cefalu WT. The integral role of clinical research in clinical care. *N Engl J Med* 2003;348:1386-8.

- Matthay M, Zimmerman GA, Esmon C, et al. Future research directions in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1027-35.
- Miller FG, Rosenstein DL. The therapeutic orientation to clinical trials. *N Engl J Med* 2003;348:1383-6.
- Moren P. Los hospitales de una misma región deberán ser más cooperativos. *Diario Médico*. Del 16 de junio de 2003.
- Nathan DG. Careers in translational research. Historical perspectives, future challenges. *JAMA* 2002;287:2424-7.
- Nathan DG. Clinical research. Perceptions, reality, and proposed solutions. *JAMA* 1998;280:1427-31.
- Ochoa L. El pacto de estado por la ciencia reclama estabilidad para la investigación. *Gaceta Médica*. Del 23 al 29 de febrero de 2003.
- Pons JMV. Passat, present i futur de la recerca. 29 de abril de 2003. www.aatrm.net.
- Rodés J, Trilla A. Investigación clínica: del laboratorio al paciente. *Med Clin (Barc)* 2003;121:189-91.
- Villar J. Futuro de la formación científica de los profesionales sanitarios en los hospitales del Sistema nacional de Salud. *Med Clin (Barc)* 2003;120:707-10.

DISCUSIÓN

F. BOSCH: Has hablado de la telemedicina como integración de la medicina, monitorización y atención a distancia. ¿Cuál es la situación actual al respecto en vuestro centro?

LL. BLANCH: Se trata de un proyecto que todavía está en fase embrionaria. Lo que sí sabemos es que en muchas ocasiones los pacientes críticos se encuentran en un lugar en el que no existe gente con conocimiento suficiente para atenderlos inmediatamente. Cuando una persona desarrolla, por ejemplo, una insuficiencia respiratoria aguda o una sepsis grave, lo que ocurra en las dos primeras horas es crucial. Su pronóstico va a depender de la actuación inmediata, decidida y pertinente. Lo que ocurre es que muchas veces estas situaciones ocurren en hospitales a distancia, dentro de ambulancias, etc., donde no está el conocimiento, a pesar de que existen muy buenos profesionales. Fuera de nuestro país existen algunas iniciativas en la que se está empezando a tratar el concepto de medicina intensiva a distancia, para que se puedan proporcionar estos conocimientos a través de la telemedicina, por ejemplo. Actualmente estamos trabajando en este concepto de monitorización a distancia que, además de solucionar estos problemas, podría servir para aportar conocimientos.

V. ALFARO: Esta parte de la expansión comercial que indicabas en la investigación, ¿se plantea

como una cuestión de servicios a empresas en el sentido de ofertar los investigadores o las propias técnicas o, como ocurre en algunos parques científicos, se plantea la posibilidad de crear empresas *spin-off* con el apoyo administrativo del parque?

LL. BLANCH: Los profesionales normalmente tienen ideas que, contando con la participación de la industria y otros *partners*, pueden llevar a desarrollos industriales que se apliquen a la salud. Desde la Corporación trabajamos, por ejemplo, con diseños de robótica y de transmisión de imagen. En consecuencia, habrá que buscar emprendedores que crean en ello y que quieran colaborar, ya sea industria, *family & friends* o patentes. Nosotros creemos en el mercado de la innovación como complementario a la investigación actual. Por ello, y aprovechando que estamos en un entorno industrial, intentamos lanzar este mensaje al mundo empresarial, de innovación o entidades financieras de nuestro entorno.

F. SORIGUER: Acaba de salir una ley que cambia potencialmente buena parte de la redistribución de los recursos, de la gestión de los recursos científicos. A algunas comunidades, como Cataluña, las coge muy bien colocadas, pero a la mayoría las deja descolocadas. ¿Podrías explicar los aspectos interesantes de esta ley y a la vez matizarla?

LL. BLANCH: Creo que es un paso más hacia las redes de centros y de grupos, y de esta manera aunar esfuerzos entre instituciones que tengan algo en común. Los institutos de investigación sanitaria van a tener que decidir con quién van a interaccionar y de qué manera. Como yo lo entiendo, habrá recursos comunes para los centros de apoyo e infraestructura en el marco del instituto y no necesariamente para cada centro. ¿Qué es lo que tienen que definir muy bien los distintos centros que decidan trabajar juntos en un instituto? El marco jurídico. Esto y que el mayor no se quede con todos los recursos. Por ejemplo, si un hospital de tamaño medio se junta con uno grande pero el centro de apoyo es muchísimo mejor en el hospital medio, los recursos deberían ir ahí.

A mi modo de ver, es una nueva filosofía absolutamente atractiva, sobre todo para hospitales como el nuestro, con 750 camas, que atiende a más de 30.000 pacientes ingresados al año, pero con capacidad limitada de inversión para innovación tecnológica. Son hospitales que necesitan colaborar con otros. Por tanto, yo creo que con esta ley el instituto gana potencial y el país gana potencial investigador.

F. SORIGUER: Sin embargo, sería coherente que este proyecto de la política de redes quedara paralizado, ya que en su momento, cuando se produjo un concierto de Farmaindustria y el anterior ministerio, fue impugnado por comunidades autónomas como la andaluza, que por entonces estaba en la oposición.

LL. BLANCH: Preguntando a la gente que participa en redes de grupos y centros con voluntad de colaboración, todos ellos están muy contentos. Se ha abierto una puerta que antes estaba cerrada y se ha creado realmente un trabajo mucho más multidisciplinario de información. Después estarán los motivos políticos, yo ya ni entro ni salgo, pero creo que éste va a ser un avance para la investigación en nuestro país. Sobre todo sí, tal como se ha comentado, se invierte más dinero. En mi opinión, este dinero debe ir a los grupos consolidados y emergentes, que son los que garantizarán un resultado en salud, ya que se ha demostrado que la política de dar un poquito a todo el mundo no es la mejor.

Y. ÁLVAREZ: Me ha sorprendido que dijera que el glutatión, en las membranas pulmonares, cau-

sara algún tipo de aumento de la permeabilidad, porque no he visto ninguna persona alcohólica o con dependencia al alcohol que tuviera un distrés y edema agudo de pulmón por esta causa.

LL. BLANCH: En el estudio mencionado, la presencia de alcohol alteraba la homeostasis del glutatión y se afectaba la secreción de surfactante en los neumocitos tipo 2. Estos autores observaron que las ratas tratadas con alcohol desarrollaban más lesión pulmonar. En pacientes sometidos a ventilación mecánica con diagnóstico de sepsis y traumatismos graves, se observó que la incidencia de insuficiencia respiratoria aguda era mayor en el grupo de pacientes con antecedentes de ingesta elevada de alcohol. Este ejemplo es muy interesante, ya que enseña cómo a partir de una observación epidemiológica se plantea una pregunta y que hay que recurrir a la investigación básica para contestarla.

Y. ÁLVAREZ: Sostiene que los médicos tendríamos que ser economistas. Estoy de acuerdo en que tenemos que saber el valor de las cosas, pero éticamente tenemos que ofrecer al paciente lo mejor, aunque en ese momento sea carísimo. Nuestro problema no debe ser el económico sino el asistencial.

LL. BLANCH: Economía de la salud y ética son perfectamente compatibles. La economía de la salud sólo la podemos realizar los médicos. ¿Cómo? Pues, por ejemplo, si sabemos que la combinación de dos medicamentos es mucho más barata y ofrece lo mismo que un solo fármaco, debemos dar la más barata y de esta manera realizar economía de salud. O si tratamos bien a los pacientes en urgencias, comprando los aparatos necesarios y adecuados, evitaremos tantas horas de ingreso y ahorraremos dinero. Obviamente, el listón ético tiene que estar al máximo pero también debemos tener en cuenta que los recursos son limitados. La economía de la salud la debemos realizar nosotros también, ya que el economista no es quien trata al paciente. Sin embargo, no nos dejan tocar este tema porque tradicionalmente nos ven como malgastadores y como si no pudiésemos entenderlo. Esto es un gran error. Los médicos debemos trabajar junto con los economistas y participar en las decisiones.

Investigación básica-experimental en gastroenterología: ¿una actividad alejada de la práctica clínica?

J.M. Piqué Badía

Servicio de Gastroenterología, Institut de Malalties Digestives i Metabòliques, Hospital Clínic, Universidad de Barcelona.

Hay quien cree que la investigación en biomedicina es una actividad completamente a parte de la práctica asistencial. Incluso, todos conocemos personas del ámbito sanitario que argumentan que un médico que dedica una parte importante de su tiempo a la investigación es un médico con un perfil de calidad asistencial bajo. Nada más erróneo que este concepto. No hay investigación médica más relevante que la que surge de las incertidumbres clínicas que uno encuentra en la práctica diaria de la medicina y un médico asistencial que compatibiliza esta práctica con la investigación suele tener una mayor capacidad para agregar a su competencia profesional el espíritu crítico y el método científico, tan importante en la práctica de la medicina.

Guiados por este concepto, en el Servicio de Gastroenterología del Institut de Malalties Digestives i Metabòliques del Hospital Clínic de Barcelona hemos estructurado nuestro trabajo en unidades funcionales. Estas unidades, que son multidisciplinarias e incluyen a profesionales de otros muchos servicios, tienen la misión de responsabilizarse de la calidad asistencial de la enfermedad o enfermedades que engloban, de desarrollar investigación clínica y experimental en el área concreta y también de ofrecer los aspectos docentes sobre estas enfermedades a residentes y becarios. La base para esta investigación surge de dos aspectos clínicos: la protocolización de la práctica asistencial a partir de guías clínicas y del registro de la actividad en bases de datos. Confeccionar protocolos y guías clínicas le permite a uno identificar las lagunas que la evidencia científica tiene en la respuesta de algunas preguntas clínicas y, por tanto, la existencia de una oportunidad de investigación. El registro de la actividad en una base de datos permite analizar el cumplimiento de protocolos y guías clínicas y evaluar la calidad del proceso asistencial realizado, pero también sirve de base para la realización de estudios clínicos.

Las unidades funcionales existentes en nuestro Servicio son la Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal, la Unidad de Cáncer Colorrectal, la Unidad de Esófago y Estómago, la Unidad de Páncreas y la Unidad de Hemorragia Digestiva. Cada unidad tiene asignada un coordinador que, en general, surge del liderazgo natural en la actividad específica de la unidad y está formada por médicos, becarios y enfermeras.

La existencia en nuestro Servicio de un Laboratorio de Investigación Experimental creado en 1989 permite que, además de la imprescindible investigación clínica, los integrantes de las unidades puedan llevar a cabo estudios experimentales y básicos. Para que ello sea viable, la mayoría de responsables de las unidades funcionales y algunos de sus miembros han llevado a cabo estancias formativas en diferentes departamentos de investigación en universidades de EE.UU. antes de poner en marcha grupos de investigación en una determinada línea en nuestro hospital.

Las líneas de investigación básicas desarrolladas siempre tienen como punto de partida una o varias enfermedades, pero hay una gran interacción entre los distintos grupos de investigación al existir líneas transversales de investigación que tienen como base el estudio de los mecanismos moleculares o genéticos de la inflamación gastrointestinal como hecho clínico relevante por sí mismo o como sustrato de las lesiones premalignas y del desarrollo del cáncer digestivo.

Una de estas líneas que fue implementada en nuestro laboratorio en el año 1995 es la de la inflamación gastrointestinal. Los integrantes de este grupo, que se dedican clínicamente a la enfermedad inflamatoria intestinal y, en menor medida, a la gastritis por *Helicobacter pylori*, llevan años desarrollando una línea de trabajo encaminada a dilucidar cuáles son los mecanismos moleculares fisiológicos y patológicos que gobiernan los fenómenos del reclutamiento leucocitario y sus eventos predecesores como son las interac-

ciones leucocito-leucocito, leucocito-plaqueta y leucocito-Endotelio.

Para estudiar estos fenómenos contamos básicamente con dos aproximaciones experimentales. Una de las aproximaciones utiliza las "cámaras de flujo", en las que uno puede estudiar en un sistema artificial las interacciones entre leucocitos y entre leucocitos y plaquetas y las interacciones entre Endotelio y leucocitos. La otra aproximación utiliza la "microscopía intravital" en la cual, y mediante un sistema de microscopía invertida o de fluorescencia, se puede estudiar en el animal vivo estas interacciones celulares y cuantificar el rodamiento, la adhesión y la emigración de los leucocitos en una vena del mesenterio, del intestino o del estómago.

El proceso de reclutamiento leucocitario se inicia con las interacciones leucocito-leucocito que inducen una disminución de la velocidad de flujo del leucocito y un fenómeno de rodamiento por encima del Endotelio. El segundo paso tiene lugar al activarse las interacciones leucocito-Endotelio, lo cual promueve la adhesión firme de los leucocitos a la superficie Endotelial. A partir de esta adhesión firme los leucocitos pueden emigrar hacia el intersticio conformando el fenómeno de reclutamiento leucocitario consustancial de cualquier foco de inflamación tisular¹⁻³.

El conocimiento de los determinantes moleculares de estas interacciones permite conocer los mecanismos fisiológicos del reclutamiento leucocitario y las alteraciones que se producen en éste en determinadas enfermedades. Así, sabemos que los fenómenos de rodamiento leucocitario son gobernados básicamente por las selectinas expresadas en las plaquetas (P-selectina), el Endotelio (E-selectina) o los mismos leucocitos (L-selectina) y que los fenómenos de adhesión del leucocito al Endotelio son gobernados básicamente por las integrinas (ICAM-1, VCAM-1 y MadCam-1)¹⁻³.

Para conocer la implicación y funcionalidad de estas moléculas disponemos de diferentes herramientas. La implicación puede asumirse mediante la cuantificación de la expresión de éstas, y ello puede realizarse con técnicas de inmunohistoquímica *ex vivo*, pero con mucha mayor precisión con la técnica del doble anticuerpo marcado que desarrolló uno de los médicos de nuestro grupo⁴. La funcionalidad la podemos estudiar mediante la inmunoneutralización *in vivo* con anticuerpos dirigidos contra cada una de las moléculas de adhesión o mediante el uso de animales genéticamente manipulados con deficiencia de expresión génica de una determinada molécula.

A título de ejemplo, detallaremos dos líneas experimentales. En una de ellas comprobamos que en los estómagos de los ratones infectados por *H. pylori* existía una significativa interacción leucocito-leucocito y leucocito-plaqueta, formándose unos agregados de leucocito-plaqueta que presentaban fenómenos de rodamiento y adhesión Endotelial que en ningún caso existían en los animales control⁵. Pudimos comprobar que este fenómeno estaba íntimamente relacionado con la sobreexpresión de algunas selectinas, pero más específicamente de P-selectina, y que la administración de anticuerpos contra esta selectina inhibía profundamente la formación de estos agregados. De estos datos se pasó a los estudios piloto en humanos, comprobándose que los leucocitos de sangre periférica de los pacientes infectados por *H. pylori* tenían una sobreexpresión de P-selectina, una sobreexpresión que se atenuaba significativamente tras la erradicación de la infección⁵. En este momento esta línea experimental está intentando dilucidar las implicaciones clínicas que ello pueda tener en el fenómeno descrito de una posible relación entre infección por *H. pylori* y un mayor riesgo de enfermedad coronaria.

En la otra línea experimental hemos estado investigando si existía en la enfermedad inflamatoria intestinal una sobreexpresión de alguna de las moléculas implicadas en la relación leucocito-Endotelio y si ello podría tener alguna contribución patogénica a la inflamación crónica del intestino que presentan estos pacientes. En un conjunto de estudios sucesivos hemos podido caracterizar que existen alteraciones de los fenómenos de rodamiento y adhesión leucocitaria en distintos modelos experimentales de esta enfermedad⁶⁻¹⁰. Además, mediante estrategias de inmunoneutralización de diferentes moléculas de adhesión, o bien utilizando animales genéticamente deficientes en alguna de estas moléculas, hemos podido constatar que aunque tanto P-selectina como ICAM-1, MadCam-1 y VCAM-1 participan en este proceso de incremento de los fenómenos de rodamiento y adhesión leucocitaria, sólo la manipulación farmacológica de VCAM-1 tiene un significativo efecto en la evolución de la inflamación intestinal y en las repercusiones sistémicas de esta enfermedad en el animal⁶⁻¹⁰.

Esta observación experimental documentada en distintos modelos animales ha constituido la base para pasar a estudios clínicos en humanos y en los últimos 2 años se han publicado 2 estudios que demuestran que la administración de anti-VLA₄, el contrarreceptor de VCAM-1, es efectiva en el tratamiento del brote agudo de la enfermedad de Crohn^{11,12}.

Este conjunto de trabajos constituye un buen ejemplo de cómo una línea de investigación experimental desarrollada por clínicos puede completar la información necesaria para transformar un concepto experimental en una nueva oportunidad de tratamiento farmacológico para los pacientes afectados de una determinada enfermedad. Este tipo de investigación denominada traslacional o de transferencia es hoy día un objetivo básico a potenciar por las autoridades científicas de la mayoría de los países del mundo occidental¹³. El objetivo es acercar la ciencia básica a su entorno de aplicabilidad práctica y poder trasladar así de forma más rápida y eficiente el beneficio de la investigación, concretado en una mejora de la calidad de vida y en un mejor estado de salud, a la población general que es quien, al fin y al cabo, sufraga con sus impuestos los gastos de la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Panes J, Piqué JM. Leukocyte-endothelium interaction: inflammation and gastric damage. *Gastroenterol Hepatol* 1997;20(Suppl 2):22-32.
2. Panes J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1998;114:1066-90.
3. Panés J. Adhesion molecules: their role in pathophysiology and treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol* 1999;22:514-24.
4. Panes J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G, et al. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am J Physiol* 1995;269(6 Pt 2):H1955-64.
5. Elizalde JI, Gomez J, Panes J, Lozano M, Casadevall M, Ramirez J, et al. Platelet activation in mice and human *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Invest* 1997;100:996-1005.
6. Sans M, Panés J, Ardite E, Elizalde JI, Arce Y, Elena M, et al. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 1999;116:874-83.
7. Soriano A, Panés J, Salas A, Salas A, Sans M, Gironella M, et al. VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1 immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Lab Invest* 2000;80:1541-51.
8. Sans M, Salas A, Soriano A, Prats N, Gironella M, Pizcueta P, et al. Differential role of selectins in experimental colitis. *Gastroenterology* 2001;120:1162-72.
9. Gironella M, Mollá M, Salas A, Soriano A, Sans M, Closa D, et al. The role of P-selectin in experimental colitis as determined by antibody immunoblockade and genetically deficient mice. *J Leukoc Biol* 2002;72:56-64.
10. Soriano A, Gironella M, Massaguer A, May FEB, Salas A, Sans M, et al. Trefoil peptide TFF2 treatment reduces VCAM-1 expression and leukocyte recruitment in experimental intestinal inflammation. *J Leukoc Biol* 2004;75:214-23.
11. Gordon FH, Lai CW, Hamilton MI, Allison MC, Srivastava ED, Fouweather MG, et al. A randomized placebo-controlled trial of a humanized monoclonal antibody to alpha4 integrin in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001;121:268-74.
12. Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, Malchow HA, Rask-Madsen J, Rutgeerts P, et al; Natalizumab Pan-European Study Group. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;348:24-32.
13. Lenfant C. Clinical research to clinical practice. Lost in translation? *N Engl J Med* 2003;349:868-74.

DISCUSIÓN

F. ARNALICH: Observo muchas veces que cuando se da una dosis pequeña se produce una respuesta, que cuando se da la dosis adecuada se produce una respuesta mayor y que cuando se vuelve a dar dosis mayores a la adecuada vuelve a bajar la respuesta. Entiendo que esto se debe a que en un momento determinado el mecanismo se satura y que se debería encontrar un resultado más o menos parecido al que se encuentra con la dosis adecuada. ¿Por qué disminuye el efecto?

J.M. PIQUÉ: Los fármacos nunca tienen acciones especializadas puras. Tienen diferentes acciones y diferentes mecanismos moleculares o farmacológicos, y esto está muy relacionado con la dosis. Probablemente siempre hay ventanas

terapéuticas que tienen un efecto más especializado sobre un determinado receptor, sobre un determinado mecanismo molecular, y a partir del aumento de la dosis ya estamos provocando otros efectos suplementarios. Por eso, los farmacólogos siempre están buscando fármacos que tengan una ventana terapéutica suficientemente amplia como para que esto no sea realmente un problema. Pero ésta es una circunstancia constante en investigación experimental.

F. ARNALICH: ¿Cómo se puede interpretar que aumentase la tasa de recurrencia o que aumentase la inflamación cuando se administraban anticuerpos sin que fuera mucho mayor la dosis del fármaco?

J.M. PLOUÉ: De hecho, la disminución de la respuesta fue sólo modesta y normalmente esto no es motivo de estudio. Simplemente hacemos diferentes dosis para sentar cuál es la que tiene un mayor efecto y para luego pasar a los siguientes estudios. ¿Qué posibilidades hay? Muchas. Ninguno de estos anticuerpos moleculares es absolutamente puro. Es probable que haya interacciones con otras moléculas de adhesión en un momento determinado y que pueda haber efectos contrarreguladores. Casi nunca hay un mecanismo absolutamente específico para ningún tipo de molécula y ésta puede ser la explicación, pero en todo caso ello no fue motivo de estudio.

F. ARNALICH: Yo soy residente de Oftalmología en el Hospital Ramón y Cajal y me llama la atención que en muchas ocasiones se da importancia a pequeñas variaciones, por ejemplo a un 1% de disminución o aumento de la agudeza visual. En algunas de las gráficas de su estudio se aprecia muy poca diferencia entre el placebo y el tratamiento cuando se da una dosis un poco mayor de la adecuada y la mejoría, a lo mejor sólo se daba en un 2 o en un 3% de los pacientes.

J.M. PLOUÉ: Hay dos aspectos a tener en cuenta. Uno, depende de la ganancia que uno obtiene con los fármacos que utiliza actualmente. Pequeñas ganancias por encima de lo que se consigue con el fármaco asistencial que uno utiliza normalmente pueden ser relevantes. Sin embargo, en los últimos años hemos aprendido que esto tenemos que analizarlo, desde el punto de vista clínico, con otro parámetro: el número necesario de pacientes a tratar para que, utilizando el fármaco A, suceda algo diferente a lo que hacemos con el fármaco B. Esto nos da la ganancia clínica terapéutica, que es otra forma de analizar más precisa que la de un porcentaje de cambio en cuanto a la respuesta o la remisión. En algunas enfermedades este porcentaje de cambio va a ser irrelevante desde el punto de vista clínico y en otras enfermedades, en cambio, va a ser muy relevante. Y dos, también tenemos que aplicar el análisis de coste-beneficio, es decir, saber si aquel incremento de número de pacientes necesario a tratar con este fármaco con respecto al anterior nos justifica el desembolso económico que va a suponer para un sistema público de salud.

LL. BLANCH: Yo vengo del ámbito de los cuidados intensivos y me gustaría ahondar en el tema de

los tratamientos, que en este campo han fracasado bastante. Por ejemplo, los tratamientos con anticuerpos monoclonales o con corticoides, etc., muchos de ellos publicados, tienen resultados negativos porque se ha inhibido toda la inflamación y se ha demostrado que han incrementado la mortalidad. Sólo ahora se está viendo, tras el conocimiento de los mecanismos inflamatorios más íntimos, que quizás las dosis tienen que ser muchísimo más pequeñas para inhibir la respuesta inflamatoria anómala. Además, se han gastado una gran cantidad de recursos quizá innecesariamente en estudios en fase III, cuando en realidad los mecanismos moleculares íntimos no se conocían, y se han obtenido unos resultados clínicos yo diría que muy pobres.

J.M. PLOUÉ: En esto hay dos factores muy críticos. Uno, las dosis para obtener aquel objetivo concreto, y dos, el tiempo de administración, porque los acontecimientos inflamatorios y lo que viene después, como puede ser el fallo multiorgánico en caso de pacientes críticos, es una cascada de acontecimientos en la que cada uno tiene su tiempo, y si no lo aplicas en el tiempo determinado puede resultar más deletéreo que beneficioso. Por ejemplo, esto lo hemos observado con el uso de corticoides en el caso del shock séptico. Varios estudios señalaron que no eran efectivos, pero recientemente hemos sabido que posiblemente sí pueden ser efectivos siempre y cuando se utilicen en fases muy iniciales donde existe un estado de sepsis pero todavía no de shock. Esto hace que probablemente tengamos ventanas, no solamente en dosis, sino también en tiempos determinados de aplicación de los fármacos en las situaciones más agudas. Probablemente sea más dramático que en el caso de las crónicas.

F. SORIGUER: Vosotros trabajáis en una enfermedad inflamatoria intestinal. Mi grupo trabaja en una enfermedad inflamatoria que es la obesidad y la diabetes. En mi opinión, la palabra inflamación se ha quedado corta. Trabajamos con las mismas moléculas, la B-alfa, la interleucina 6, la interleucina 1, etc. No deja de ser interesante la historia del factor de necrosis tumoral alfa. Se llamó caquectina, ya que explicaba la caquexia, y es la misma sustancia que ahora sirve para explicar la obesidad. Me parece que estamos en los albores de una redefinición del concepto de inflamación, porque hasta ahora este concepto, más que aclarar, estorba.

J.M. PLOUÉ: En la inflamación es muy importante detectar moléculas que se sobreexpresan en una situación concreta, porque si tú quieres actuar sobre moléculas que constitutivamente ya realizan un papel muy importante en la homeostasis de un tejido, probablemente va a ser muy difícil poder diseccionar cuál es el efecto que tú quieres provocar sin tocar otros efectos necesarios de la molécula. En cambio, cuando hay moléculas, como el caso de VCAM-1, que no están normalmente expresadas en el tejido y solamente aparecen en la inflamación, probablemente la ventana terapéutica que obtenemos modulando esta molécula es mucho mayor que con otras. La gran expresión de este tipo de fenómenos la tenemos muy presente los que hemos trabajado con óxido nítrico. Cantidades pequeñas de óxido nítrico son buenas para regular mecanismos fisiológicos o con fines terapéuticos, pero a partir de una determinada cantidad de este mismo factor biológico puede empezar a apreciarse efectos deletéreos de éste. ¿Cuál es la ventana terapéutica para poder intervenir? Cuando podemos cortar la cantidad de óxido nítrico originada a partir de su mecanismo de inducción, el resultado será probablemente siempre beneficioso. En cambio, en cuanto nos movamos reduciendo por debajo de lo que es el óxido nítrico constitutivo estaremos interfiriendo en algún efecto fisiológico necesario. La biología tiene estas peculiaridades y no hay ninguna molécula que actúe totalmente independiente de otras moléculas y que no tenga efectos paradójicos en relación con la cantidad presente en un tejido. Toda molécula está inmersa en una cascada de eventos en la que diseccionar un punto y ser efectivos no resulta fácil. Yo creo que el hecho de que esta regulación sea difícil no debe hacernos pensar que no constituye una oportunidad para la terapia en el futuro.

D. GARCÍA-OLMO: Nosotros trabajamos en metástasis y, por ello, en la adhesión celular. Sabemos que los leucocitos activados lo que hacen es sacar hacia fuera ácido desoxirribonucleico (ADN), hacer una secreción activa de ADN, creando lo que se llaman *nets*. El pasado 5 de marzo salieron publicadas en la portada de *Science* unas imágenes impresionantes de leucocitos activados repletos de ADN. Lo que ocurre es que este ADN es muy sensible y se pierde fácilmente con cualquier procedimiento de laboratorio. Y ahí se enganchan muchas moléculas, y estas *nets* o redes parece que son fundamentales en el mundo de la adhesión. De he-

cho, esto nos interesa a nosotros desde el punto de vista de la producción de metástasis, de la capacidad de reproducción de metástasis y no desde el punto de vista de la inflamación ni de la adhesión. ¿Habéis observado alguna implicación de este ADN extracelular o de ADN libre en la adhesión o en el fenómeno inflamatorio?

J.M. PLOUÉ: No hemos estudiado el ADN en este contexto, pero nuestro laboratorio es transversal entre inflamación y cáncer y también hemos trabajado en adhesión y cáncer. En un modelo parecido al que vosotros utilizáis, que es la implantación ortotópica de cáncer de colon en ratones, pudimos observar que hay un impedimento de la adhesión leucocitaria en los vasos del tumor, mientras que en los vasos del tejido sano circundante está completamente preservada. Estudiamos cuáles eran los mecanismos que modulaban todo esto y únicamente funcionaron dos: inhibir en ciertas cantidades óxido nítrico y el TGF-beta, y éste en una forma verdaderamente significativa. Estos resultados los publicamos en *Gastroenterology* hace unos 3 o 4 años.

D. GARCÍA-OLMO: ¿Sabes que los pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, durante los brotes, tienen un nivel muy alto de ADN y ácido ribonucleico libre en sangre en la fracción plasmática?

J.M. PLOUÉ: De hecho, también hemos trabajado en células circulantes y tuvimos la sorpresa que al observar ADN y luego ácido ribonucleico apreciamos que los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal que utilizamos como grupo control, aparte de los sujetos sanos, tenían una cantidad de ADN circulante parecida a la de los pacientes con cáncer.

Y. ÁLVAREZ: Este ADN, ¿de dónde sale?

D. GARCÍA-OLMO: Secreción activa por la célula. Es el único caso, el de los leucocitos activados, en el que se ha demostrado una secreción activa. Esto está muy bien explicado en el *Science* del 5 de marzo de 2004.

Y. ÁLVAREZ: ¿Existe alguna relación entre el *H. pylori* o cualquier otra infección y la enfermedad de Crohn? Porque se sabe que muchas infecciones pueden causar trombos.

J.M. PLOUÉ: Se desconoce cuál es el elemento inicial de la enfermedad inflamatoria intestinal. La

hipótesis en la que estamos trabajando todos los investigadores en este campo es que existe una respuesta genéticamente alterada, con una gran carga inmunológica, a algún antígeno intraluminal que puede ser exógeno o endógeno. De hecho, el gen NOD2/CARD15 es el que regula fisiológicamente la capacidad de nuestro organismo de reconocer nuestras propias bacterias y mutaciones de este gen o pérdidas de su funcionalidad pueden estar involucrados en la patogenia de esta enfermedad.

Respecto a la otra cuestión, es evidente que en la enfermedad inflamatoria intestinal, fundamentalmente la enfermedad de Crohn, hay fenómenos locales de trombosis, y esto ya lo demostró Hawkey hace años en un estudio de *casts* con siliconas de las piezas de colectomía en el que observó que había una cantidad de anomalías morfológicas significativas en los pacientes con esta enfermedad. Nosotros estamos estudiando los polimorfismos del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) y hemos observado que los pacientes que sufren una mutación en el 4G/4G del PAI tienen una evolución diferente de la enfermedad con una mayor tendencia a desarrollar fistulas. Es decir, no tienen más mutaciones en este polimorfismo los pacientes con Crohn que los controles, pero los pacientes con Crohn que tienen esta mutación tienen una altísima probabilidad de poco tiempo de evolucionar hacia la enfermedad fistulizante. Probablemente, factores tromboembólicos de la propia pared pueden propiciar la progresión de esta enfermedad hacia la serosa. En este momento estamos estudiando la posibilidad de ofrecer a estos pacientes una estrategia terapéutica mucho más agresiva desde el inicio para prevenir esta circunstancia, e incluso la posibilidad de actuar con un fármaco que cambie la modificación de la activación del plasminógeno.

S. ERILL: Me gustaría añadir una anécdota respecto al efecto temporal de la administración de un fármaco. Me contó un amigo su experiencia con un producto que se llamó TP-5, constituido por los cinco primeros aminoácidos de la timoestimulina, y que se intentó utilizar en el tratamiento de la artritis reumatoide. Este medicamento, administrado en forma de bolo, mediante

una infusión de media hora de duración o una infusión continua en 24 horas, producía tres tipos de efecto totalmente distintos entre ellos, a pesar de que era el mismo medicamento y la misma dosis total.

J.R. MORANDEIRA: Al final de la década de 1980 se pusieron de moda los estudios sobre la microcirculación. Entonces había un grupo que realizaba estudios en cerdos a los que inyectaban un volumen de toxina y estudiaban cómo se producía el shock séptico. El shock se producía por un proceso inflamatorio en la microcirculación, con los rodantes y los adherentes, que terminaban bloqueando los *shunts* arteriovenosos distales. Llegaba un momento en el que incluso diagnosticaban, antes de que hubiera ningún signo clínico, el fracaso multiorgánico en el shock. ¿No ocurre algo parecido a eso en el Crohn, es decir, que se produzca un bloqueo final terminal, una necrosis, que es la responsable de que aparezca la sintomatología, etc.?

J.M. PLOUÉ: La enfermedad de Crohn es una enfermedad crónica y no podemos hacer la similitud con una situación aguda, pero sí que probablemente hacia la fase final hay fenómenos vasculares puros. Ahora bien, esta fase terminal probablemente no va a ser nunca una diana terapéutica, porque cuando llegamos a este punto esto es difícil de revertir. Tenemos que ir a los pasos previos. Ésta es una enfermedad que finalmente crea necrosis, produce destrucción de toda la pared, aspecto que no se produce con la colitis ulcerosa, que siempre está limitada a la mucosa. Ahora estamos trabajando, por ejemplo, con el PAI, para ver si podemos hacer alguna actuación terapéutica, pero tiene que ser muy inicial, tan inicial como la historia de los corticoides en la sepsis. Nosotros también hemos estado trabajando en isquemia-reperfusión y en sepsis y, midiendo a través de espectrofotometría de reflexión directamente en el intestino, hemos observado que el consumo de oxígeno y pequeñas variaciones en el flujo sanguíneo intestinal antes en una situación de sepsis son altamente predictivos del desarrollo de shock. Por consiguiente, sí que hay una fase en la que cualquier inflamación tiene un correlato de alteración de la microcirculación.

Investigación básica en nefrología: plomo, hipertensión arterial y gota

A.I. Sánchez Fructuoso

Servicio de Nefrología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

El plomo (Pb) es fuente de una de las intoxicaciones crónicas y silentes más frecuentes del mundo actual. Desde hace mucho tiempo fue reconocido como un factor de riesgo "industrial"; su efecto a largo plazo como tóxico "ambiental" ha tomado notable importancia en los últimos años por la patología tan variada que conlleva. Dentro del mundo laboral, España es un país con alto índice de contaminación, desconociéndose, sin embargo, el número de intoxicaciones que se producen en la población general teóricamente "no expuesta". Actualmente la toxicidad por Pb es uno de los problemas más importantes de salud pública en EE.UU., indicando las estadísticas que en ese país entre 3 y 4 millones de niños entre 6 meses y 5 años de edad y aproximadamente 400.000 *in utero* están expuestos cada año al Pb. Las fuentes de intoxicación ambiental por Pb son múltiples; en nuestro medio quizás los más representativos serían: *a)* agua domiciliaria, por liberación de este metal desde las tuberías, conectores y soldaduras¹; *b)* alimentos, vinos^{2,3} y otras bebidas alcohólicas contenidas en receptáculos con alto contenido en Pb, como cerámicas vidriadas con este metal⁴; *c)* polución atmosférica⁴, ejerciendo aquí un importante papel la gasolina plomada, y *d)* pinturas^{4,5}.

Las manifestaciones del saturnismo crónico son múltiples y pueden variar mucho de unos individuos a otros. Estudios realizados en trabajadores expuestos al Pb demuestran mayor incidencia de hipertensión arterial (HTA)⁶⁻⁸, de complicaciones cardiovasculares de la HTA⁸, gota⁹⁻¹¹ e insuficiencia renal (IR)^{6,9}. Ante la aparición de estos cuadros clínicos en un trabajador expuesto al Pb, el diagnóstico etiológico es fácil; el problema aparece, sin embargo, en personas no expuestas laboralmente pero que puedan estar intoxicadas (p. ej., cuando las instalaciones de fontanería de la casa son de Pb y el agua tiene un pH ácido se forman sales solubles que convierten al Pb en una fuente de intoxicación); enton-

ces la HTA puede ser catalogada como esencial o quedar la causa de la gota o de la IR sin filiar y, por tanto, sin tratar adecuadamente.

Para diagnosticar esta enfermedad disponemos de los siguientes parámetros: *a)* plumbemia, que cuando es elevada es útil, pero valores normales de ésta no descartan saturnismo crónico^{1,12}, puesto que puede verse modificada por muchos factores como son el tiempo entre la exposición al metal y la determinación del Pb en sangre¹² o el equilibrio entre el Pb plasmático y el depositado en los tejidos blandos y hueso; *b)* determinación de Pb en la orina tras la administración de edetato disódico cálcico (EDTA), es la prueba fundamental para el diagnóstico de esta enfermedad siendo muchos los autores que coinciden en ello^{6,7,9-12}; *c)* determinación de la actividad eritrocítica de la ALA deshidrasa y de la protoporfirina eritrocitaria¹, y *d)* biopsia ósea, especialmente indicada en aquellas personas en las que no se pueda realizar el test del EDTA porque su uso esté contraindicado (IR terminal)¹³.

El efecto del Pb como causante de IR en la población general no estaba tan claro. Mientras que había autores (entre los que destacan por sus grandes contribuciones, el grupo de Weeden y Batuman, así como por supuesto los investigadores australianos como Emmerson)^{6,11,12,14} que no se cuestionaban la existencia de la nefropatía secundaria a intoxicación crónica por Pb, había otros, entre los que destaca el grupo europeo de Ritz, van de Vyver, Nuyts y Behringer^{7,13}, que dudaban sobre su existencia pensando que quizá en la IR crónica se producía una mayor acumulación de Pb en el organismo (por disminución de su eliminación), y que depósitos altos de Pb no eran la causa de la IR sino su consecuencia. Además, en la población general (teóricamente no expuesta al tóxico) los métodos de investigación utilizados, a nuestro juicio, no habían sido los adecuados, ya que para el estudio de grandes poblaciones el parámetro evaluado fue el Pb en

sangre, que tiene poco valor como indicador de los depósitos corporales de Pb, informándonos sólo de intoxicación reciente.

Por ello nosotros diseñamos un estudio para responder a tres preguntas fundamentales: ¿Podría ser el Pb causa de la IR o era consecuencia de la misma?, ¿podría ser el Pb el agente causal de IR en pacientes gotosos de la población general? Y, finalmente, ¿podría ser el Pb el agente causal de IR en pacientes afectados de "HTA esencial"? Para ello estudiamos hipertensos esenciales con función renal normal que habían sido remitidos al hospital por difícil control de la presión arterial ($n = 104$), pacientes con IR presumiblemente secundaria a nefroangiosclerosis ($n = 68$) y pacientes con IR, HTA y gota ($n = 64$)¹⁵. Realizamos en todos ellos el test de EDTA. Descartamos para nuestro estudio a todos aquellos individuos que tenían posibilidad de haber tenido contacto previo laboral con el Pb, puesto que la relación Pb-IR en el campo laboral nos parecía suficientemente probada, buscábamos observar si ésta también se daba en la población general. Dado que uno de nuestros objetivos era investigar si el aumento de la carga corporal de Pb era causa de IR o si era consecuencia de ésta, estudiamos dos poblaciones control, una con IR de causa claramente establecida (glomerulonefritis, poliquistosis, etc.) ($n = 30$) y otra de voluntarios sanos ($n = 20$). Ninguno de los trabajos publicados contaba con esta premisa.

La eliminación de Pb tras la administración de EDTA fue similar en el grupo de sujetos sanos y pacientes con IR de causa conocida (324 ± 21 frente a $323 \pm 27 \mu\text{g}/72 \text{ h}$) lo cual descartaba la hipótesis de que la IR fuera causa de aumento de los depósitos de Pb en el organismo.

Además, observamos que un 15% de los pacientes hipertensos con función renal normal, un 44% de los pacientes con nefroangiosclerosis y un 69% de los pacientes con IR presumiblemente secundaria a gota tenían depósitos patológicos de Pb. Sin embargo, en los pacientes con IR crónica de causa conocida no observamos en ningún caso test de EDTA patológico. Estos resultados nos hicieron sospechar que el Pb podía ser en esos casos el nexo de unión entre HTA e IR crónica.

"Nefroangiosclerosis benigna" es el término utilizado para describir la alteración renal causada por la HTA esencial. Este diagnóstico se realiza ante un paciente con IR e HTA de larga evolución, retinopatía hipertensiva, hipertrofia de ventrículo izquierdo y proteinuria leve, que suele iniciarse después de la HTA, en el que se han descartado otras causas de enfermedad renal.

Otros hallazgos a favor de este diagnóstico son raza negra, historia familiar positiva y comienzo de la HTA entre los 25 y los 45 años. Sin embargo, cada vez se duda más de la existencia de esta enfermedad dentro del campo de la HTA esencial. Mientras que existe evidencia sobre que la hipertensión maligna es causa de IR, no la hay sobre la hipertensión benigna y se cree que debajo de aquellas que progresan a la IR existen distintos factores involucrados entre los que puede estar el Pb. Recientemente Vupputuri et al¹⁶ han demostrado la existencia de una correlación positiva entre Pb en sangre y presión arterial en una amplia muestra de población afroamericana. Este hallazgo ha sido de gran relevancia en lo que a salud pública se refiere. Es más, se ha observado que la población afroamericana de EE.UU. tiene mayores concentraciones de Pb en sangre que la población caucasiana (probablemente por el menor nivel socioeconómico que les hace estar más expuestos a fuentes de intoxicación), y esto podría explicar, al menos en parte, la mayor incidencia de HTA en esta población. Además, el hecho de que la HTA produzca de forma más frecuente IR en esta población hace pensar que en ellos se dan otros mecanismos causantes de daño renal entre los que puede encontrarse el Pb.

La situación es similar para la nefropatía gotosa. Algunos autores piensan que ésta es una entidad que no existe, puesto que estudios de seguimiento realizados en la década de 1970 demostraron que la hiperuricemia y la gota primaria rara vez progresaban a IR a no ser que coexistieran otras causas de daño renal y, entre ellas, fundamentalmente HTA^{17,18}. Una vez más el Pb pudiera ser el nexo de unión entre gota, HTA e IR. Además, se debe recordar que en los estudios con gran número de muestra en hipertensos esenciales se ha demostrado que la hiperuricemia es uno de los factores de mal pronóstico involucrados en el desarrollo de nefropatía¹⁹.

Una vez asumido que el Pb podría ser el causante de la IR en nuestros pacientes, decidimos iniciar tratamiento con EDTA para tratar la intoxicación. Sin embargo, encontramos dos obstáculos fundamentales: primero, el uso de EDTA podría ser problemático en pacientes con IR, puesto que se le consideraba un fármaco nefrotóxico, y segundo, un estudio experimental en ratas había demostrado que el EDTA a dosis altas podía producir redistribución del Pb en el organismo desde órganos inertes como el hueso a órganos críticos como el cerebro²⁰. Esto nos llevó a diseñar un estudio experimental, intoxicando ratas durante 3 meses (con dosis bajas de Pb para simular una intoxicación crónica) y tratándolas

después con EDTA a dosis equivalentes a las usadas en humanos. Realizamos determinaciones analíticas, estudios histológicos a nivel renal y determinaciones de Pb en distintos órganos. Pretendíamos por una parte estudiar los efectos de la intoxicación por Pb y posteriormente los producidos por el tratamiento^{21,22}.

Basándonos en nuestro estudio y en los realizados por otros autores^{6,11,12}, el EDTA, utilizado como método de diagnóstico para la intoxicación por Pb, parecía no ser nefrotóxico en humanos. Sin embargo, desconocíamos si el uso de dosis acumulativas de quelante, como sería necesario en el tratamiento de la intoxicación por Pb, podría originar daño renal. Los estudios previos sobre la evolución de la histopatología en animales después de tratamiento con EDTA eran muy escasos y en ellos se utilizaban altas dosis de Pb durante la intoxicación y altas dosis de quelante (400 mg/kg) aplicadas durante muy poco tiempo (de 1 a 5 días)²³⁻²⁵. En nuestro estudio experimental no apreciamos signos de toxicidad por EDTA (degeneración hidrópica de las células del túbulo proximal) como los observados por otros autores^{26,27}, aunque esas lesiones se describieron con el uso de dosis altas del quelante. Nosotros, usando dosis equivalentes a las empleadas en humanos, no encontramos signos de nefrotoxicidad por EDTA, lo cual eliminaba nuestro primer obstáculo.

Respecto al depósito de Pb en tejidos, el riñón fue el órgano en el que se obtuvieron más altas concentraciones de Pb. Una vez finalizada la intoxicación se produjo una disminución significativa de los valores de Pb renal tanto en el grupo que recibió EDTA como en el que no, pero fue mucho más rápida y significativa en el grupo que recibió tratamiento. En el cerebro los valores de Pb alcanzaron su pico máximo a los 2 meses de intoxicación. La disminución fue más rápida en el grupo tratado. En el hueso, a los 60 días de intoxicación se alcanzaron unos valores que casi multiplicaban por 20 a los basales. A lo largo del período de intoxicación estos valores no sufrieron variaciones. Tras suprimir la fuente de intoxicación no se consiguieron disminuciones de las cifras de Pb en hueso. Con el tratamiento tampoco se obtuvo ninguna variación. Esto nos hizo llegar a la hipótesis de que probablemente el Pb se queda de por vida almacenado en el hueso, inaccesible al quelante y siendo probablemente una fuente de re intoxicación endógena y en situaciones de alta remodelación ósea, como embarazo, osteoporosis, etc., pueden llevar a liberalización de Pb desde el hueso. Un hallazgo importante en nuestro modelo de intoxicación, y con la pauta de

tratamiento que diseñamos, fue que no encontramos redistribución del Pb con el uso del quelante desde órganos inertes como el hueso a órganos críticos como el cerebro, lo cual nos eliminaba el segundo obstáculo para el tratamiento de nuestros pacientes.

Dentro de los hallazgos histológicos secundarios a la intoxicación por Pb, la afectación de arterias de pequeño y mediano calibre (hipertrofia y vacuolización) y de arteriolas en el riñón fueron los hallazgos más importantes de nuestro estudio. Estos hallazgos, buscados de forma expresa, hasta ahora no habían sido referidos en la bibliografía médica en estudios experimentales con Pb. De hecho, había autores que especulaban que la nefropatía por Pb en ratas podía ser distinta a la de los humanos al no aparecer alteraciones vasculares²⁸, e incluso había quien dudaba de que el Pb pudiera ser fuente de hipertensión al no lograr reproducirla en ratas y no encontrar lesiones anatomopatológicas sugerentes de ésta²⁹. Sin embargo, en nuestro modelo, a diferencia de los estudios previos, además de observar que las ratas desarrollaban HTA encontramos alteraciones vasculares compatibles con HTA. Probablemente el éxito de nuestro estudio se debió a que utilizamos un modelo de intoxicación muy similar al que probablemente se debe de producir en el hombre, usando durante el período de intoxicación dosis muy bajas de Pb, pero mantenidas durante largo tiempo. Otro hallazgo interesante fue que el tratamiento con EDTA consiguió enlenteceer la progresión de las lesiones y en algunos casos mejorarlas.

Siguiendo con la relación Pb-HTA, nuestro grupo realizó otro estudio experimental para intentar encontrar qué mecanismos estaban involucrados en esta alteración³⁰. En este estudio se compararon ratas intoxicadas con dosis bajas de Pb durante 30 días frente a un grupo de animales no intoxicado, presentándose las siguientes alteraciones:

- Menor respuesta a la relajación endotelial inducida por la acetilcolina.
- Aumento de la expresión proteica de la sintasa del óxido nítrico endotelial.
- Menor respuesta a la relajación endotelial inducida por nitroprusiato sódico.
- Disminución de la actividad de la guanilatociclasa soluble (tanto espontánea como estimulada por nitroprusiato sódico).

Es decir, el Pb produce alteración en la respuesta vasodilatadora afectando tanto a la vía dependiente del endotelio como a la vía no dependiente del endotelio. Estas alteraciones se prevenían si

los animales recibían vitamina C simultáneamente con el Pb, lo que indicaba un papel de los radicales libres de oxígeno en la regulación del sistema relajante de la pared vascular óxido nítrico/GMPc.

A la vista de nuestros trabajos en el campo de la intoxicación crónica por Pb, podemos concluir que:

– La IR *per se* no parece ser causa de acumulación excesiva de Pb en el organismo.

– La intoxicación crónica por Pb puede ser un factor etiológico en la aparición de HTA en la población general. Un porcentaje importante de pacientes hipertensos que desarrollan IR puede no estar afectado de HTA esencial sino de hipertensión secundaria a intoxicación crónica por Pb.

– El Pb puede ser el factor desencadenante de IR en pacientes gotosos.

– El Pb en sangre es un parámetro indicador de exposición reciente, pero no excluye exposición anterior, puesto que disminuye rápidamente una vez que cesa el contacto con la fuente de intoxicación.

– El riñón es uno de los órganos más afectados, apareciendo importantes lesiones histológicas en los túbulos proximales, intersticio y vasos.

– El hueso es un órgano de depósito de Pb a largo plazo, difícilmente accesible al tratamiento quelante.

– El EDTA, a las dosis utilizadas en nuestro estudio, no ha producido nefrotoxicidad ni redistribución de Pb en el organismo.

– El tratamiento con EDTA consigue frenar la evolución de las lesiones renales y enlentecer la progresión hacia la IR. Con este fármaco también se consigue una disminución más rápida del Pb renal y cerebral.

– La exposición al Pb produce una alteración en la relajación vascular y afecta tanto a factores dependientes del endotelio como no dependientes del endotelio y produce una disminución de la expresión de la guanilatociclasa soluble en la pared vascular. Estos efectos se evitan con el pretratamiento con vitamina C, lo que sugiere un papel de los radicales libres de oxígeno en la intoxicación por Pb.

BIBLIOGRAFÍA

- Otero A, Mora B, Cao M, Rodríguez L. Epidemiología de la intoxicación por plomo de agua domiciliar y saturnismo. Valoración de parámetros para el estudio de grandes poblaciones. *Rev San Hig Pub* 1987;61:799-810.
- Grillo A, López-Artiguez M, Castilla L, Castro M, García Bragado F, Repetto M. El vino como fuente contaminante de plomo: estudio en el área sur de Sevilla. *Med Clin (Barc)* 1990;95:281-5.
- Dally S, Girre C, Hispard E, Thomas G, Fournier L. High blood lead level in alcoholics: Wine vs beer. *Drug Alcohol Depend* 1989;23:45-8.
- Fielding JE, Russo PK. Exposure to lead: sources and effects. *N Engl J Med* 1977;297:943-4.
- Gerson B. Lead. *Clin Lab Med* 1990;10(3):441-57.
- Batuman V, Landy E, Maesaka JK, Wedeen RP. Contribution of lead to hypertension with renal impairment. *N Engl J Med* 1983;309(1):17-21.
- Ritz E, Mann J, Stoeppler M. Lead and the kidney. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1988;17:241-74.
- Pirkle JL, Schwartz J, Landis JR, Harlan WR. The relationship between blood lead levels and blood pressure and its cardiovascular risk implications. *Am J Epidemiol* 1985;121(2):246-58.
- Ball GV, Sorensen LB. Pathogenesis of hyperuricemia in saturnine gout. *N Engl J Med* 1969;280(22):1199-202.
- Colleoni N, D'Amico G. Chronic renal accumulation as a possible cause of renal failure in gouty patients. *Nephron* 1986;44(1):32-5.
- Batuman V, Maesaka JK, Haddad B, Tepper E, Landy E, Wedeen RP. The role of lead in gout nephropathy. *N Engl J Med* 1981;304(9):520-3.
- Wedeen RP, Malik DK, Batuman V. Detection and treatment of occupational lead nephropathy. *Arch Intern Med* 1979;139(1):53-7.
- Van de Vyver FL, D'Haese PC, Visser WJ, Elseviers MM, Knippenberg LJ, Lamberts LV, et al. Bone lead in dialysis patients. *Kidney Int* 1988;33(2):601-7.
- Emmerson BT, Lecky DS. The lead content of bone in subjects without recognized past lead exposure and in patients with renal disease. *Aust Ann Med* 1963;12:139-42.
- Sanchez-Fructuoso AI, Torralbo A, Arroyo M, Luque M, Ruilope LM, Santos JL, et al. Occult lead intoxication as a cause of hypertension and renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11(9):1775-80.
- Vupputuri S, He J, Muntner P, Bazzano LA, Whelton PK, Batuman V. Relation of blood lead to blood pressure in African-Americans and whites: the Third National Health and Examination Survey. *Hypertension* 2003;41:463-8.
- Fessel WJ. Renal outcomes of gout and hyperuricemia. *Am J Med* 1979;67:74-82.
- Yu T, Berger L. Impaired renal function in gout. Its association with hypertensive vascular disease and intrinsic renal disease. *Am J Med* 1982;72:95-100.
- Johnson RJ, Kivlighn SD, Kim Y, Suga S, Fogo AB. Reappraisal of the pathogenesis and consequences of hyperuricemia in hypertension, cardiovascular disease, and renal disease. *Am J Kidney Dis* 1999;33:225-34.
- Cory-Slechta D, Weiss B, Cox CH. Mobilization and redistribution of lead over the course of calcium disodium ethylenediamine tetraacetate chelation therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;243:804-13.
- Sanchez-Fructuoso AI, Cano M, Arroyo M, Fernandez C, Prats D, Barrientos A. Lead mobilization

- during calcium disodium ethylenediaminetetraacetate chelation therapy in treatment of chronic lead poisoning. *Am J Kidney Dis* 2002;40(1):51-8.
22. Sanchez-Fructuoso AI, Blanco J, Cano M, Ortega L, Arroyo M, Fernandez C, et al. Experimental lead nephropathy: treatment with calcium disodium ethylenediaminetetraacetate. *Am J Kidney Dis* 2002;40(1):59-67.
 23. Goyer RA, Wilson MH. Lead-induced inclusion bodies: results of ethylenediaminetetraacetic acid treatment. *Lab Invest* 1975;32(2):149-56.
 24. Goyer RA, Cherian MG, Delaquerriere-Richardson L. Renal effects of repeated administration of calcium disodium ethylenediaminetetraacetate during excessive exposure to lead in rats. *J Environ Pathol Toxicol* 1978;1(4):403-10.
 25. Goyer RA, Cherian MG. Ascorbic acid and EDTA treatment of lead toxicity in rats. *Life Sci* 1979;24(5):433-8.
 26. Foreman H, Finnegan C, Lushbaugh CC. Nephrotoxic hazard from uncontrolled edathamil calcium-disodium therapy. *J Am Med Assoc* 1956;160(12):1042-6.
 27. Reuber MD, Schmeiler GC. Edetate kidney lesions in rats. *Arch Environ Health* 1962;5:430-5.
 28. Khalil-Manesh F, Gonick HC, Cohen AH, Alinovi R, Bergamaschi E, Mutti A, et al. Experimental model of lead nephropathy. I. Continuous high-dose lead administration. *Kidney Int* 1992;41(5):1192-203.
 29. Nowack R, Wiecek A, Exner B, Gretz N, Ritz E. Chronic lead exposure in rats: effects on blood pressure. *Eur J Clin Invest* 1993;23(7):433-43.
 30. Marques M, Millas I, Jimenez A, Garcia-Colis E, Rodriguez-Feo JA, Velasco S, et al. Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertension in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(12):2594-600.

DISCUSIÓN

S. ERILL: ¿Sabes si existen datos de disfunción endotelial expresada como disfunción eréctil en pacientes con intoxicación por Pb?

A.I. SANCHEZ: No se han hecho estudios al respecto con el Pb. Sí que hay gente de nuestro grupo que está estudiando mecanismos de disfunción endotelial en los pacientes con disfunción eréctil, pero en el Pb no se ha realizado.

F. SORIGUER: Fuera de los casos de intoxicación profesional, ¿de dónde procede este Pb?

A.I. SANCHEZ: Una de las fuentes de intoxicación más importantes es el agua de los domicilios. Otro ejemplo son las cerámicas. Se dio el caso de un niño que se intoxicó por Pb simplemente porque su madre le daba todas las mañanas un zumo de limón en un vaso de cerámica. A causa del pH ácido del zumo se producía una gran suelta de Pb. También se han descrito en España altas concentraciones de Pb en vino, por ejemplo en estos vinos que se mantienen en tinajas vidriadas. Hay muchísimas fuentes de intoxicación y el problema es que desde que se produce la intoxicación hasta que la clínica se manifiesta pasan muchos años.

V. ALFARO: El hecho de que la intoxicación de Pb se acompañe de una alteración de la relajación endotelial, ¿podría provocar fenómenos de isquemia/reperfusión que afectaran al metabolismo de nucleótidos, aparición de xantinoxidasa, etc.?

A.I. SANCHEZ: Probablemente. Esta línea la está retomando ahora mismo una persona de mi grupo y se están haciendo estudios más específicos en este ámbito.

D. BARRAL: ¿Cuáles son los síntomas principales de una intoxicación por Pb?

A.I. SANCHEZ: La intoxicación crónica por Pb no tiene ningún síntoma hasta que no pasa mucho tiempo. En la intoxicación aguda, el síntoma es el típico cólico saturnino, pero las intoxicaciones crónicas son muy silentes, no dan ninguna clínica. El Pb se deposita y posteriormente, con el paso del tiempo, empiezan a aparecer las lesiones. No existe ninguna sintomatología.

D. BARRAL: Yo creía que el EDTA, que es una sustancia que se utiliza mucho en hematología, era más tóxico.

A.I. SANCHEZ: Cuando empezamos a realizar el test de EDTA simplemente consistía en administrar los gramos a pacientes con IR. Al principio hacíamos creatinina pre, creatinina post, porque nos daba miedo. Cuando se empezó a utilizar el EDTA eran intoxicaciones muy graves por Pb, agudas y con dosis muy altas. Incluso a raíz de este trabajo con ratas tratamos a pacientes con IR muy avanzadas hasta que conseguimos que la eliminación de Pb en la orina se normalizase. Sin embargo, estos pacientes posteriormente se trasplantaron, la IR progresó, sufrieron un trasplante renal y les repetimos el

test postrasplante y siguieron teniendo depósitos patológicos, probablemente porque el hueso sea la fuente de intoxicación.

Y. ÁLVAREZ: Tras una intoxicación aguda por Pb, y sabiendo que se deposita en el hueso, ¿aconsejaría el tratamiento con EDTA durante largo tiempo? Porque se sabe que con otros metales, como el tungsteno, que también se depositan en el hueso actuando como el calcio, hay una redistribución muy lenta con niveles sanguíneos muy bajos durante largo tiempo.

A.I. SANCHEZ: El Pb en el hueso se encuentra en dos lugares. Probablemente si se puede tratar en el lugar de mayor remodelación, pero el quelante no puede hacer nada en el Pb que se incorpora en los cristales de hidroxiapatita. Sin embargo, si se aconseja el tratamiento de la intoxicación porque, si no se consigue disminuirlo en el hueso, al menos se consigue disminuirlo en otros órganos como el riñón o el cerebro, que es donde se sabe que causa más patologías. Ahora mismo, por ejemplo, en el campo de la pediatría el problema con el Pb está siendo muy importante en cuanto al desarrollo intelectual de los niños. Incluso existen hipótesis que han implicado al Pb en la enfermedad de Alzheimer. Es un gran desconocido.

Probablemente, en el tratamiento a largo plazo con el EDTA se pueda ir liberando el Pb que está más superficial a medida que vaya avanzando el remodelado óseo. Desde luego, el Pb que ya está incorporado dentro de la estructura del hueso no es tratable. Puede que nos quedásemos cortos y a lo mejor debimos seguir tratando durante mucho más tiempo a las ratas. Cuando diseñas un estudio nunca sabes si estás acertando con el tiempo de evolución.

D. GARCÍA-OLMO: Tengo entendido que el EDTA no está autorizado por la Agencia Española de Medicamentos para su empleo en estos casos de IR. Entonces me gustaría comentar el paso de la básica a la clínica. Muchas veces en el laboratorio observamos determinados resultados y cuando queremos hacer el salto a la clínica nos encontramos con muchos problemas en el momento de plantearlo a nuestro comité ético.

A.I. SANCHEZ: En el prospecto del EDTA pone "contraindicado en insuficiencia renal". Este estudio se realizó en los años 1990-1992. En aquella época no existían tantas restricciones éticas. De todas maneras, ya se habían publicado algunos artículos que decían que utilizándolo simplemente para hacer el test no se había producido deterioro de la función renal. No creo que deteriore la función renal, como hemos visto en nuestro estudio. Sin embargo, tiene muy mala fama por las dosis tan altas que se usaron en los primeros tiempos. Eran dosis casi 20 veces superiores a las que se utilizan ahora.

F. SORIGUER: Una de las fuentes de intoxicación por Pb más importantes son los cazadores. De hecho, se produjo una gran epidemia de Pb a través de anátidas en la desembocadura de las marismas del Guadalquivir. Probablemente, después de centenares de años disparando con Pb, las anátidas se comieron la munición. Ahora, por fin, ya han prohibido que se fabrique munición con Pb.

A.I. SANCHEZ: Hay muchos casos curiosos relacionados con la intoxicación por Pb. Al Pb se le atribuye la caída del Imperio Romano. Goya tuvo una intoxicación aguda por Pb. Los típicos irlandeses gotosos probablemente lo fueran por el whisky destilado ilegalmente, etc.

Papel de las mitocondrias en la necrosis miocárdica por isquemia-reperusión: un reto para la investigación cardiovascular

D. García-Dorado

Laboratorio de Investigación Cardiovascular, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona.

La magnitud de la muerte celular miocárdica tiene una gran trascendencia en el pronóstico vital y en la calidad de vida de los pacientes con síndromes coronarios agudos. Después de un periodo inicial, de interés por el papel desempeñado por las mitocondrias en la muerte celular por isquemia-reperusión, al principio de la década de 1980, la investigación en esta área ha progresado muy lentamente. Sin embargo, durante los últimos años el interés se ha reavivado, en parte por el estallido de conocimientos sobre la muerte apoptótica, en la que las mitocondrias pueden ser un elemento crítico. Aunque cada vez está más claro que la apoptosis es un fenómeno poco relevante en la isquemia-reperusión miocárdica, existen nuevos datos que sugieren que las mitocondrias pueden ser importantes en la iniciación de la muerte por reperusión. Se abre así un campo de investigación apasionante cuya oportunidad y conveniencia tiene sólidas bases, y cuya ejecución supone un importante reto.

A continuación se describen los avances científicos sobre los que se basa la investigación de un nuevo papel de las mitocondrias en la muerte celular por isquemia-reperusión:

Las alteraciones de la homeostasis catiónica desempeñan un papel decisivo en la muerte celular durante la isquemia-reperusión miocárdica. No existe una definición de muerte celular universalmente válida. En el presente proyecto definiremos muerte celular como la pérdida de integridad de la membrana celular (muerte por necrosis) o la degradación internucleosomal del ADN (apoptosis). Aunque la isquemia grave conduce inexorablemente a la muerte celular, se sabe que, de acuerdo con la anterior definición, ésta ocurre de forma bastante tardía, en varias horas. La reinstauración del flujo sanguíneo es una condición indispensable para la supervivencia celular, pero, paradójicamente, desencadena con frecuencia la muerte de un elevado número

de células cuyo sarcolema estaba intacto y que no habían desarrollado apoptosis. Se ha discutido mucho si la muerte celular asociada a la reperusión es un efecto adverso de ésta, denominado generalmente "daño letal por reperusión", o refleja solamente la aceleración de un daño celular "irreversible" que hubiera conducido inexorablemente a la muerte celular algún tiempo más tarde. La relevancia de esta discusión ha sido puesta en duda por la evidencia de que la reperusión durante las primeras horas de oclusión coronaria es en todo caso beneficiosa, y nunca incrementa la muerte celular. Sin embargo, la existencia del daño letal por reperusión podría tener importantes implicaciones si fuese posible evitarlo mediante tratamientos aplicados en el momento de la reperusión. De acuerdo con esta idea, definimos daño letal por reperusión como la parte de muerte celular causada por un episodio de isquemia transitoria que puede ser prevenida mediante intervenciones realizadas en el momento de la reperusión¹.

Los mecanismos responsables de la muerte celular durante la isquemia-reperusión miocárdica no han sido completamente desvelados. Sin embargo, está claro que las alteraciones de la homeostasis catiónica desempeñan un papel fundamental en ésta. Durante la isquemia, se produce un exceso de protones y descenso del pH intracelular (pHi), y se activa el intercambiador Na⁺/H⁺ sarcolema NHE1 y el cotransportador Na⁺COO³H⁻². Estos sistemas no impiden el descenso rápido del pHi hasta valores por debajo de 6,5 en los primeros minutos de isquemia grave, y producen la entrada de Na⁺ en la célula³. La [Na⁺]_{citosol} aumenta progresivamente desde el principio de la isquemia por la entrada a través de los sistemas correctores de la acidosis intracelular y por la inactividad de la Na⁺/K⁺ ATPasa sarcolema causada por la caída (en valores negativos) del cambio de energía libre de la hidrólisis del ATP (por la caída de ATP y el aumento de

ATP y Pi)⁴. El aumento de $[Na^+]_{\text{citosol}}$ y la pérdida del potencial de membrana hacen que el intercambiador Na^+/Ca^{2+} sarcolemal opere permanentemente en modo reverso introduciendo Ca^{2+} en el citosol. La entrada de Ca^{2+} a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} es la principal causa del incremento de $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ en cardiomiocitos durante la isquemia⁵. Sin embargo, la $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ sólo comienza a elevarse cuando los miocitos desarrollan contractura por rigor isquémico, una interacción de baja energía entre actina y miosina que no depende del Ca^{2+} y que ocurre cuando la ATP alcanza niveles críticamente bajos (50-100 μM)⁶. La elevación de $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ es capaz de activar diferentes sistemas enzimáticos. Una de las consecuencias de esta activación es la degradación de elementos del citoesqueleto y del sarcolema⁷. Sin embargo, la consecuencia fisiopatológica más importante de la elevación de $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ es que determina la aparición de hipercontractura durante la reperfusión¹.

La reperfusión reinstaura rápidamente la energía libre de intercambio del ATP, y el $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ disminuye rápidamente debido en parte a la captación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico por la Ca^{2+} -ATPasa. Estudios recientes de nuestro laboratorio dentro de un proyecto previo (CICYT-SAF99/102) han demostrado que este descenso se produce a pesar de la entrada adicional de Ca^{2+} extracelular a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} sarcolemal. Este intercambiador actúa en modo reverso al principio de la reperfusión debido al incremento de $[Na^+]_{\text{citosol}}$. Este incremento es debido a la sobrecarga de Na^+ acumulada durante la isquemia, a la entrada adicional de Na^+ a través de los sistemas correctores de la acidosis citosólica (NHE1 y Na^+ -COO³H- especialmente) y a la disfunción transitoria de la Na^+/K^+ -ATPasa sarcolemal. Otros resultados del proyecto CICYT-SAF99/102 demostraron que el Na^+ puede acceder en grandes cantidades a las células a través de los *gap junctions*⁸ y que éstos pueden permanecer abiertos después de la isquemia prolongada⁹. La captación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico desencadena su liberación a través de los canales ryanodina-sensibles, el aumento de $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ y su posterior recaptación, dando lugar a amplias oscilaciones de $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ durante los primeros minutos de reperfusión¹⁰. La elevación y las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_{\text{citosol}}$ en presencia de $[ATP]_{\text{citosol}}$ normal desencadenan una actividad contráctil excesiva que puede provocar el acortamiento extremo y disrupción de la arquitectura celular en cardiomiocitos aislados, y la ro-

tura del sarcolema y la muerte celular en los cardiomiocitos *in situ* (hipercontractura). La hipercontractura se ve favorecida por la fragilidad del citoesqueleto secundaria a la isquemia previa, en parte causada por cambios en el estado de fosforilación de sus elementos, y por la rápida desaparición de la acidosis intracelular¹¹, ya que el pH ácido es un potente inhibidor de la actividad contráctil. Por otra parte, la normalización abrupta de la osmolalidad extracelular junto con la entrada de Na^+ al citosol causan edema celular¹². La hipercontractura, el edema y la interacción mecánica con el tejido adyacente imponen una sobrecarga mecánica al sarcolema, cuya resistencia mecánica está disminuida por la activación enzimática y el catabolismo lipídico que se producen durante la isquemia, y, probablemente, por la agresión de radicales libres durante la reperfusión¹³. La hipercontractura y rotura del sarcolema pueden propagarse a cardiomiocitos adyacentes mediante el paso de Na^+ del sarcolema a través de los *gap junctions*¹⁴. Este tipo de muerte celular asociada a hipercontractura y rotura del sarcolema durante los primeros minutos de reperfusión es responsable de la mayor parte de la muerte celular total causada por la isquemia miocárdica transitoria¹⁴⁻¹⁶.

Cada vez existen más indicios de que las mitocondrias desempeñan un papel importante en la génesis de la muerte celular relacionada con alteraciones catiónicas por isquemia-reperfusión.

En la década de 1980 se prestó mucha atención a las mitocondrias como causa de muerte celular durante la isquemia-reperfusión. Las observaciones al microscopio electrónico demostraron la precocidad del edema mitocondrial durante la isquemia y la asociación entre la presencia de gránulos amorfos en la matriz mitocondrial y la muerte celular. La hipótesis más aceptada era que la entrada masiva de Ca^{2+} en las mitocondrias durante la reperfusión causaba el daño de éstas y la muerte celular por pérdida de la respiración mitocondrial. Esta hipótesis fue contestada por la observación de que la hipercontractura desencadenada por la reoxigenación ocurre en miocitos que han recuperado su competencia metabólica y, por tanto, su función mitocondrial¹⁰. Sin embargo, observaciones recientes sugieren que la participación de las mitocondrias en la muerte celular podría estar relacionada con otros mecanismos.

Las mitocondrias participan activamente en la homeostasis iónica celular. Las mitocondrias constan de una matriz y una doble membrana, y

suponen más del 30% del volumen celular de los cardiomiocitos. La membrana celular interna (no así la externa) posee una muy baja permeabilidad a los iones y sistemas transportadores iónicos específicos, por lo que las concentraciones iónicas en la matriz pueden ser muy diferentes a las del citosol. De hecho, la principal función de las mitocondrias, la síntesis de ATP en la F_0F_1 ATPasa en la membrana mitocondrial interna, está acoplada a la entrada de H^+ en la matriz a favor de un importante gradiente electroquímico. La matriz posee una H^+ mucho menor que la citosólica, y es muy electronegativa, con un potencial transmembrana ($\Delta\psi$) de aproximadamente -180 mV. Este gradiente está mantenido por la extrusión de H^+ asociada al transporte de electrones en la cadena respiratoria. La entrada de H^+ en la matriz puede realizarse, además de por la F_0F_1 ATPasa, a través de un intercambiador Na^+/H^+ mitocondrial, y de un intercambiador K^+/H^+ . De hecho, el gradiente de H^+ es utilizado para mantener la homeostasis iónica mitocondrial y para el transporte de metabolitos en contra de gradientes químicos¹⁷. La entrada de K^+ en la matriz puede ser favorecida en determinadas condiciones por la apertura de canales específicos dependientes de la concentración de ATP (canales K^+ ATP). La $[Ca^{2+}]_{mito}$ es normalmente menor que la citosólica y desempeña un papel clave en la regulación de la respiración mitocondrial a través de varios mecanismos¹⁸. La $[Ca^{2+}]_{mito}$ puede variar con rapidez y contribuir a la formación y progresión de ondas de Ca^{2+} , dentro de la célula y a su propagación entre células adyacentes a través de los *gap junctions*. En condiciones normales, el Ca^{2+} entra en la matriz a través de un unitransportador a favor de su gradiente electroquímico y sale acoplado a la entrada de Na^+ a través de un intercambiador Na^+/Ca^{2+} . El Ca^{2+} puede abandonar también la matriz mitocondrial a través del poro de transición (véase más adelante). Cada vez existe más evidencia de que este canal puede tener un papel en los cambios fisiológicos de Ca^{2+} ¹⁹. El Na^+ que entra a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} no se acumula en la matriz porque es expulsado al citosol a través del intercambiador Na^+/H^+ que opera introduciendo H^+ a favor del enorme gradiente electroquímico para este ión. Dado el volumen del compartimento mitocondrial es fácil comprender que el transporte de iones entre la mitocondria y el citosol tenga importantes efectos sobre las concentraciones iónicas en éste. Además, las mitocondrias presentan una relación anatomofuncional íntima con el retículo sarcoplásmico, de manera que las concentraciones iónicas

en ambos compartimentos están íntima y reciprocamente influidas²⁰.

Las mitocondrias modulan las alteraciones iónicas mitocondriales causadas por la isquemia-reperfusión. Durante los primeros momentos de la isquemia miocárdica, antes de la aparición del rigor isquémico la acidosis celular ya se ha establecido, y el aumento importante de $[Na^+]_{citosol}$ induce la entrada de Ca^{2+} al citosol a través del modo reverso del intercambiador Na^+/Ca^{2+} . Sin embargo, el Ca^{2+} citosólico se mantiene normal hasta el desarrollo de rigor. Observaciones recientes de nuestro grupo sugieren que las mitocondrias contribuyen a mantener la normalidad de $[Ca^{2+}]_{citosol}$ secuestrando Ca^{2+} en paralelo con el retículo sarcoplásmico. Nuestros resultados preliminares también sugieren que el aumento brusco de $[Ca^{2+}]_{citosol}$ después del rigor es debido no sólo a la detención de la entrada de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico al "agotarse" el ATP, sino también a la salida de Ca^{2+} de la mitocondria al perderse el potencial de membrana.

Otros resultados de nuestro grupo habían demostrado que la captación de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias contribuye a la rápida caída de $[Ca^{2+}]_{citosol}$ durante los momentos iniciales de la reoxigenación, ya que la caída se sigue produciendo cuando se bloquea la Ca^{2+} ATPasa sarcolemal con tapsigarguina¹². Más aun, dichos resultados son compatibles con la interpretación de que el bloqueo de la entrada de Ca^{2+} al citosol a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} sarcolemal protege a los miocitos mediante la disminución de la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y la subsecuente disminución de la liberación de Ca^{2+} mitocondrial al citosol.

La interrelación entre los cambios en $[Ca^{2+}]_{citosol}$ y $[Ca^{2+}]_{mito}$ es probablemente mucho más compleja que un simple intercambio de iones entre ambos compartimentos. Por ejemplo, se ha demostrado recientemente que el aumento de $[Ca^{2+}]_{mito}$ tiene un efecto inhibitorio sobre el intercambiador Na^+/Ca^{2+} sarcolemal por mecanismos desconocidos²¹.

Las mitocondrias desempeñan un papel clave en la muerte celular por apoptosis o necrosis. El mecanismo más importante y mejor conocido por el que las mitocondrias pueden inducir la apoptosis implica la apertura del poro de transición mitocondrial, un megacanal que permite el paso libre e indiscriminado de moléculas de hasta 1,5 kDa²²⁻²⁴. El poro de transición se forma por el ensamblaje de subunidades proteicas en regiones de la pared mitocondrial en las que la

membrana externa e interna están en estrecha proximidad. La estructura del poro se conoce sólo parcialmente. Se sabe que incluye proteínas de la membrana interna, el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y proteínas de la membrana externa, como la porina (canal de aniones dependiente de voltaje), que actúan conjuntamente. Además, incluye un receptor de benzodiazepinas y la ciclofilina D²⁵. La probabilidad de apertura del poro de transición está regulada por varios factores, que incluyen el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), la concentración mitocondrial de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$) y H^+ (pH_{mito}) y ATP. La elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ y la caída de $\Delta\psi$ (y quizás también su aumento anormal) favorecen la apertura del poro, mientras que la acidosis y el ATP la inhiben. Diversas moléculas, y especialmente los radicales libres del O_2 , pueden actuar como estimuladores externos de la apertura, mientras que otras sustancias como la ciclosporina A, que se une a la ciclofilina D, o el ácido bongkrékico, que se une a ANT, son capaces de dificultarla o inhibirla²⁶. La apertura del poro mitocondrial está regulada por una familia de proteínas (Bcl-2) que se expresan en la membrana mitocondrial externa. La familia de productos Bcl-2 tiene potentes efectos pro (Bax) o antiapoptosis (Bcl-2) y regula no sólo la apertura del poro de transición sino también otros sistemas transportadores mitocondriales, incluyendo el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ²⁷.

Durante la reperfusión, después de un período prolongado de isquemia, coinciden circunstancias que favorecen la apertura del poro, especialmente, elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$, generación de radicales libres de O_2 y normalización del pH ²⁸.

La apertura masiva del poro de transición (muchos poros en muchas mitocondrias) causa edema mitocondrial grave que puede resultar en rotura de la membrana mitocondrial externa y liberación de citocromo C y otros activadores de la cadena de las caspasas^{22,29}. Aún en ausencia de rotura de la membrana externa, la apertura del poro de transición puede permitir la salida de citocromo C y la inducción de apoptosis. Si la liberación de citocromo C, un elemento de la cadena respiratoria, es muy importante, puede comprometer la respiración mitocondrial hasta el punto de que no se sintetice suficiente ATP para ejecutar el programa de muerte celular, y la muerte se produce por necrosis. Por otra parte, la apertura del poro de transición puede resultar en la activación de múltiples sistemas enzimáticos distintos de las proteasas capaces de causar fragilidad del sarcolema y el citoesqueleto^{30,31}.

En mitocondrias con sobrecarga de Ca^{2+} , la apertura del poro de transición puede resultar en la salida al citosol de importantes cantidades de este ión, y en el aumento de la concentración citosólica de éste. Incluso si el poro de transición no se abre, la normalización de la función mitocondrial conlleva la liberación del exceso de Ca^{2+} en el citosol, probablemente a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La normalización de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ supone en cualquier caso un mecanismo potencial de sobrecarga citosólica de Ca^{2+} durante la reperfusión, tal como se ha discutido en el apartado anterior, y puede favorecer el desarrollo de hipercontractura. Por otra parte, estudios preliminares en miocitos permeabilizados expuestos a distintas concentraciones de ATP demuestran que la reelevación inadecuada de la concentración de ATP tras el desarrollo de rigor por exposición a concentraciones decrecientes puede causar una paradójica exacerbación de la contractura en ausencia de Ca^{2+} ³². Esta observación sugiere que si la recuperación inadecuada de la síntesis de ATP durante la reperfusión eleva la concentración citosólica de ATP lo suficiente para alcanzar el rango crítico de desarrollo de contractura por rigor, pero no lo suficiente como para sobrepasar rápidamente dicho rango, se puede producir una paradójica contractura por rigor durante la reperfusión.

Finalmente, las alteraciones mitocondriales pueden contribuir a la pérdida de la integridad del sarcolema. Las mitocondrias constituyen la principal fuente intracelular de radicales libres durante la reoxigenación, y son a la vez una importante diana para los radicales libres^{33,34}. Los radicales libres del oxígeno contribuyen a la activación de múltiples sistemas celulares, entre ellos el poro de transición mitocondrial (véase más adelante) y, además, pueden incrementar directamente la fragilidad del sarcolema¹³ y favorecer la muerte celular por necrosis.

Las mitocondrias parecen estar implicadas en la génesis del efecto protector de los tratamientos que se han mostrado más útiles contra la muerte celular miocárdica por isquemia-reperfusión. Las mitocondrias participan en el mecanismo protector del preconditionamiento isquémico. Aunque el mecanismo último por el que la exposición a breves episodios de isquemia-reperfusión protegen el miocardio contra la muerte celular secundaria a un episodio de isquemia prolongada subsiguiente no se conoce^{35,36}, existe creciente acuerdo sobre la participación en éste de las mitocondrias³⁷ y, en particular, de los canales K^+ -ATP mitocondriales^{34,38}. En la mayoría de las condi-

ciones investigadas, la protección puede ser evocada por fármacos que abren estos canales y abolida por otros que los bloquean. Los sistemas de transducción de señales que llevan desde el estímulo preconditionante hasta la apertura de los canales en la mitocondria están siendo progresivamente esclarecidos³⁹. La cadena de sucesos que conduce desde la apertura de los canales K⁺ATP mitocondriales hasta la prevención de la muerte celular no se conoce. Sin embargo, existen datos preliminares que sugieren que el edema moderado y la despolarización mitocondrial parcial son los responsables de la protección al atenuar la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial⁴⁰⁻⁴².

Las mitocondrias podrían participar de forma importante en la protección proporcionada por los bloqueadores del NHE1 y de NCX1. Existe acuerdo unánime en que el bloqueo del intercambiador Na⁺/H⁺ sarcolemal durante la isquemia miocárdica reduce drásticamente la muerte celular secundaria a isquemia-reperfusión^{28,43}. Sin embargo, el mecanismo de este efecto protector no está esclarecido. La actividad del intercambiador Na⁺/COO³H⁻ es capaz de compensar en gran medida los efectos del bloqueo de NHE1 sobre las concentraciones citosólicas de H⁺ y Na⁺. De hecho, el escaso o nulo efecto de estos bloqueadores sobre las concentraciones citosólicas de Na⁺, Ca²⁺ o H⁺^{6,11} contrasta vivamente con la magnitud del entretimiento en la caída de la concentración de ATP y del retraso en el desarrollo de rigor^{11,28}. Recientemente se ha propuesto que los inhibidores de NEH1 podrían afectar también al intercambiador Na⁺/H⁺ mitocondrial^{44,45}. Nosotros hemos observado recientemente que el bloqueador altamente selectivo HOE642 modifica dramáticamente la cinética del Ca²⁺ mitocondrial durante la inhibición metabólica en células permeabilizadas en las que no pueden existir efectos sobre NHE1 sarcolemal.

La eficacia protectora del bloqueo del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ sarcolemal NCX1 contra la muerte celular durante la reperfusión ha sido descrita sólo recientemente por nuestro grupo^{5,12}, y está lejos de ser universalmente aceptada como lo son las del preconditionamiento y la del bloqueo del intercambiador Na⁺/H⁺. Su mecanismo podría estar también relacionado con la atenuación de la sobrecarga mitocondrial de Ca²⁺ durante la reperfusión inicial como se ha descrito con anterioridad. Por otra parte, no se conoce si el inhibidor más específico de este intercambiador disponible hasta el momento atraviesa la membrana celular, ni si es capaz de bloquear también el intercambiador mitocondrial.

El conocimiento actual de las alteraciones iónicas mitocondriales inducidas por la isquemia-reperfusión es muy incompleto. *El conocimiento estructural y funcional de los transportadores iónicos es muy incompleto.* La identificación de los genes de los transportadores mitocondriales y su secuenciación no se ha completado, en contraste con lo que sucede con la mayoría de los transportadores sarcolemales¹⁷. La identidad molecular del unitransportador es objeto de discusión y muy recientemente se ha sugerido que es indistinguible del canal sarcolemal sensible a la ryanodina⁴⁶. Las similitudes y diferencias entre el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial y el NCX1 sarcolemal no han sido establecidas⁴⁷, y se discute todavía si la cinética de intercambiador mitocondrial es electroneutra (2Na⁺:1Ca²⁺) o electrogénica (3Na⁺:1Ca²⁺) como la del de NCX1⁴⁸ y si puede servir de vía de entrada de Ca²⁺ durante la isquemia⁴⁹.

No existe información sobre los cambios iónicos mitocondriales en células intactas durante la reperfusión. Aunque se ha publicado un gran número de trabajos sobre los cambios iónicos mitocondriales en distintas condiciones fisiológicas y patológicas, existen muy pocos datos sobre los cambios inducidos por la isquemia. Se discute si las mitocondrias se sobrecargan de Ca²⁺ o no durante la isquemia, si sueltan Ca²⁺ o lo captan durante la reperfusión, las vías por las que lo hacen, y la posible apertura del poro de transición durante la isquemia y la reperfusión y su relevancia. Una de las razones principales de ello es que los indicadores fluorescentes existentes supuestamente selectivos para las mitocondrias son retenidos en la matriz mitocondrial por la electro negatividad de ésta y salen de la mitocondria cuando ésta se despolariza durante la isquemia. Los estudios de adsorción atómica no distinguen entre Ca²⁺ iónico o ligado a fosfatos u otras moléculas. Los estudios en mitocondrias aisladas no pueden reproducir con exactitud los cambios citosólicos isquémicos y rompen la unidad mitocondria-retículo sarcoplásmico²⁰.

El papel del óxido nítrico (NO) en homeostasis iónica mitocondrial no ha sido estudiado. Aunque se sabe que el NO modula la respiración mitocondrial, y que tanto NO como GMPc modulan la actividad de muchos transportadores iónicos, el papel regulador de NO y el GMPc en la homeostasis iónica mitocondrial no se conoce. Más aún, se sabe ahora que en las mitocondrias se expresa de forma constitutiva una NO sintasa de tipo neural⁵⁰. Sin embargo, el papel del NO mitocon-

drial en la fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperusión no ha sido investigado, a pesar de que se sabe que el NO puede tener efectos protectores^{51,52} e inductores de apoptosis⁵³ dependiendo de las condiciones.

Las posibilidades terapéuticas de la modificación de iones mitocondriales no han sido exploradas en modelos de isquemia fuera del preconditionamiento. Los estudios que se han realizado hasta ahora se basan casi exclusivamente en modelos celulares. Los pocos estudios en corazones intactos y animales han asumido que las intervenciones producían determinados efectos sobre las concentraciones iónicas mitocondriales sin comprobarlo⁵⁴⁻⁵⁶.

Los posibles mecanismos moleculares por los que la apertura del poro de transición puede favorecer la rotura del sarcolema no se conocen. En concreto, el mecanismo de acción de la glicina, un aminoácido con un potente efecto protector contra la rotura de la membrana celular en condiciones que favorecen la apertura del poro en órganos distintos del corazón y, según observaciones nuestras no publicadas, tampoco es conocido en miocitos.

Conclusión

Existen buenas razones para pensar que las mitocondrias ejercen un papel importante en la muerte celular durante la isquemia-reperusión miocárdica, y que contienen nuevas dianas farmacológicas con alto potencial terapéutico. Varios laboratorios ya han comenzado a explorarlas, y nuestro grupo se ha sumado a esta apasionante tarea.

BIBLIOGRAFÍA

1. Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look on reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998;38:291-300.
2. Piper HM, Balsler C, Ladilov V, Schäfer M, Siegmund B, García-Dorado D. The role of Na⁺/H⁺ exchange in ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol* 1996;91:191-202.
3. Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E. Mechanism of preconditioning. Ionic alterations. *Circ Res* 1993;72:112-25.
4. Pike MM, Kitakaze M, Marban E. ²³Na-NMR measurement of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1990;259:H1767-73.
5. Ladilov Y, Haffner S, Balsler-Schäfer C, Maxeiner H, Piper HM. Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Am J Physiol* 1999;276:H1868-76.
6. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Juliá M, Inserte J, Siegmund B, Ladilov Y, et al. Protective effect of HOE642, a selective blocker of Na⁺/H⁺ exchange, against the development of rigor contracture in rat ventricular myocytes. *Am J Exp Physiol* 2000;85(1):17-25.
7. Weinbrenner C, Baines CP, Liu GS, Armstrong SC, Ganote CE, Walsh AH, et al. Fostriecin, an inhibitor of protein phosphatase 2A, limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Circulation* 1998;98:899-905.
8. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM, Soler-Soler J. Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na⁺ through gap junctions. *Circ Res* 1999;85:280-7.
9. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Lane S, Inserte J, Pina P, Mirabet M, et al. Persistence of gap junction communication during myocardial ischemia. *Am J Physiol* 2001;280(6):H2563-71.
10. Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balsler C, Piper HM. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation* 1997;96:4372-9.
11. Schafer C, Ladilov YV, Schafer M, Piper HM. Inhibition of NHE protects reoxygenated cardiomyocytes independently of anoxic Ca(2⁺) overload and acidosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(5):H2143-50.
12. Inserte J, García-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabés JA, Pina P, et al. Inhibition of reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger at the time of myocardial reperfusion limits hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res* 2002;55:739-48.
13. Schlüter KD, Jacob G, Ruiz Meana M, García-Dorado D, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by NO donors. *Am J Physiol* 1996;271:H428-34.
14. García-Dorado D, Inserte J, Ruiz Meana M, González MA, Solares J, Juliá M, et al. Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation* 1997b;96:3579-86.
15. García-Dorado D, Thérout P, Durán JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, et al. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to the modification of infarct size, infarct composition and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation* 1992a;85:1160-74.
16. Barrabés JA, García-Dorado D, Ruiz Meana M, Piper HM, Solares J, González MA, et al. Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion "in situ". Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 1995;431:519-26.
17. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999;79(4):1127-55.
18. Duchon MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 2000;529(Pt 1):57-68.

19. Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, et al. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J* 1999;76(2):725-34.
20. Arnaudeau S, Kelley WL, Walsh JV, Jr., Demareux N. Mitochondria recycle Ca(2+) to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J Biol Chem* 2001;276(31):29430-3.
21. Opuni K, Reeves JP. Feedback inhibition of sodium/calcium exchange by mitochondrial calcium accumulation. *J Biol Chem* 2000;275(28):21549-54.
22. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6(5):513-9.
23. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis. Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998;82:1111-29.
24. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-62.
25. Halestrap AP. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem J* 1991;278(Pt 3):715-9.
26. Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1997;174(1-2):167-72.
27. Zhu L, Yu Y, Chua BH, Ho YS, Kuo TH. Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by bcl-2 in the heart of transgenic mice. *J Moll Cell Cardiol* 2001;33(12):2135-44.
28. García-Dorado D, González MA, Barrabés JA, Ruiz Meana M, Solares J, Lidón RM, et al. Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange. *Cardiovasc Res* 1997a;35:80-9.
29. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
30. Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes: one paradox after another. *Cardiovasc Res* 1999;44(3):470-3.
31. Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res* 2001;89(3):273-8.
32. Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG. Phospholipase A(2)s in cell injury and death. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294(3):793-9.
33. Ruiz-Meana M, Julià M, García-Dorado D, Insete J. Reversibility of rigor shortening in isolated skinned cardiomyocytes. Supplement to *Circulation* 1996;94:I-365 (abstract).
34. Yellon DM, Baxter GF, García-Dorado D, Heusch G, Sumeray MS. Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res* 1998;37:21-33.
35. Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2001;52(2):181-98.
36. Maulick N, Engelmana RM, Rousou JA, Flack III JE, Deaton D, Das DK. Ischemic Preconditioning reduces Apoptosis by Upregulating Anti-Death Gene Bcl-2. *Circulation* 1999;100(Suppl II):II369-75.
37. Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 2002;54:101-27.
38. Ishida H, Hirota Y, Genka C, Nakazawa H, Nakaya H, Sato T. Opening of mitochondrial K(ATP) channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. *Circ Res* 2001;89(10):856-8.
39. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(2):H649-H56.
40. Menown IB, Adgey AA. Cardioprotective therapy and sodium-hydrogen exchange inhibition: current concepts and future goals. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(6):1651-3.
41. Hotta Y, Ishikawa N, Ohashi N, Matsui K. Effects of SM-20550, a selective Na⁺-H⁺ exchange inhibitor, on the ion transport of myocardial mitochondria. *Mol Cell Biochem* 2001;219(1-2):83-90.
42. Miura T, Liu Y, Goto M, Tsuchida A, Miki T, Nakano A, et al. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels play a role in cardioprotection by Na⁺-H⁺ exchange inhibition against ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(3):957-63.
43. Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 2001;89(10):891-8.
44. Beutner G, Sharma VK, Giovannucci DR, Yule DI, Sheu SS. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 2001;276(24):21482-8.
45. Li W, Shariat-Madar Z, Powers M, Sun X, Lane RD, Garlid KD. Reconstitution, identification, purification, and immunological characterization of the 110-kDa Na⁺/Ca²⁺ antiporter from beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 1992;267(25):17983-9.
46. Jung DW, Baysal K, Brierley GP. The sodium-calcium antiporter of heart mitochondria is not electro-neutral. *J Biol Chem* 1995;270(2):672-8.
47. Griffiths EJ. Reversal of mitochondrial Na/Ca exchange during metabolic inhibition in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett* 1999;453(3):400-4.
48. Lacka Z, Puskar M, Figueroa JP, Zhang J, Rajapakse N, Busija DW. Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic Biol Med* 2001;31(12):1609-15.

49. Kirshenbaum LA, de Moissac D. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 1997;96:1580-5.
50. Padilla F, García-Dorado D, Agulló L, Inserte J, Paniagua A, Mirabet S, et al. L-arginine administration prevents reperfusion-induced cardiomyocyte hypercontracture and reduces infarct size in the pig. *Cardiovasc Res* 2000;46:412-20.
51. Taimor G, Rakow A, Piper HM. Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. *FASEB J* 2001;15(13):2518-20.
52. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:1461-9.
53. Chen Z, Chua CC, Ho Ys, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(5):H2313-20.
54. Javadov SA, Lim KH, Kerr PM, Suleiman MS, Angelini GD, Halestrap AP. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 2000;45(2):360-9.
55. Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Pina P, Inserte J, Agulló L, Soler-Soler J. Caripode preserves mitochondrial protonmotive force and ATP synthesis in cardiomyocytes during ischemic conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H999-1006.
56. Ruiz-Meana M, Pina P, Rodríguez-Sinovas A, Barba I, Miró E, Mirabet M, et al. Glycine protects cardiomyocytes against lethal reperfusion injury by inhibiting mitochondrial transition pore opening. *J Physiol* 2004;558:873-82.

DISCUSIÓN

F. SORIGUER: Me gustaría comentar el concepto de área de conocimiento, ya que tú has manifestado tus dudas respecto a la delimitación entre las áreas de vascular y de cardiología. Creo que habría que tener un cierto respeto al concepto de disciplina. A mi modo de entender, las habilidades son lo que distingue una disciplina de ese concepto universal del conocimiento.

D. GARCÍA-DORADO: Efectivamente, a medida que la investigación se hace más básica existen menos fronteras. En mi laboratorio, por ejemplo, tenemos cardiólogos, bioquímicos, químicos, veterinarios, farmacéuticos, técnicos, etc. Con lo cual, en el aspecto básico las disciplinas realmente no existen y no tiene ningún sentido discutir sobre qué campos defiende cada uno. Efectivamente, en el aspecto clínico, lo que define a cada cual son las técnicas y una formación clínica, es decir, una capacidad de integrar y decidir con experiencia en su área de actividad.

F. SORIGUER: ¿Concibes que un investigador básico—que yo considero que se le debería denominar investigador preclínico— que lleva 30 años realizando esta tarea pueda dedicarse en algún momento a la clínica?

D. GARCÍA-DORADO: La investigación básica no existe como tal en el área de la cardiología ni de la biomedicina. La investigación básica es otra cosa. Por tanto, estoy completamente de acuerdo en que la investigación no se debe llamar "básica", pero no estoy de acuerdo en que se

deba denominar "preclínica", ya que muchas de las cosas que se realizan no llegan a la clínica ni tienen por qué llegar. Yo hablaría, en todo caso, de "investigación básica" entre comillas. Respecto a si se puede pasar de la clínica a la básica y de la básica a la clínica, no es una pregunta fácil de responder. Un básico que jamás ha hecho clínica no tiene la misma formación que un clínico, entre otras cosas por motivos prácticos (cuando una persona empieza una carrera básica se mantiene como básico). En cambio, hay muchos clínicos que han hecho el trasvase a la básica. Este trasvase es difícil pero posible y conlleva una serie de ventajas y desventajas. En mi caso, debo diseñar experimentos y elaborar proyectos y manuscritos sobre aspectos de biología celular y molecular. Para ello estoy en cierta desventaja con los bioquímicos, que han estado toda la vida manejando estos temas. Por otro lado, tengo la ventaja, y aquí está el truco, de que conozco muy bien la realidad del problema clínico que pretendemos abordar.

En cuanto a la capacidad de combinar ambas cosas, depende del área en la que se trabaja. Por ejemplo, en nuestro laboratorio tenemos un cardiólogo que trabaja dos días en la unidad coronaria y tres días en el laboratorio. En el laboratorio trabaja en trombosis y en el papel de las plaquetas en el daño miocárdico y en la clínica también trata con plaquetas, con lo cual es fácil trabajar con plaquetas en los dos ámbitos. Sin embargo, en otras áreas es muy difícil poder compatibilizar una cosa con la otra. Por último, me gustaría señalar que algunos investi-

gadores consideran que la investigación clínica, generalmente realizada por clínicos que atienden pacientes, es conceptualmente sencilla y quizás de un nivel intelectual menor que la investigación básica, muchas veces realizada por "investigadores profesionales". Creo que es importante darse cuenta de que ambas formas de investigación, la más básica y la más aplicada, son esenciales y complementarias y que la investigación clínica de calidad tiene la misma dignidad intelectual que la que se realiza enteramente en el laboratorio.

Y. ÁLVAREZ: En los experimentos que has presentado, me ha parecido entender que cuando se reperfunde en el corazón podría aumentar la muerte celular con el tiempo. ¿Esto tiene alguna correlación con las troponinas?

D. GARCÍA-DORADO: Las troponinas son moléculas de gran tamaño específicas del miocardio que aparecen en sangre en caso de lisis de membrana y, por tanto, son un marcador. Efectivamente, la reperfusión causa muerte celular. ¿Qué ocurre? Que la muerte celular que causa es siempre menor que la que se produciría si no se hubiese realizado la reperfusión. Por ejemplo, nosotros tenemos diez miocitos isquémicos, con isquemia intensa, y en el momento de la reperfusión se mueren siete, pero hemos salvado tres con la reperfusión. A nivel experimental nosotros, en el momento de reperfundir, intentamos que en vez de morirse siete, mueran tres miocitos. Por tanto, esto confirma que la reperfusión deba considerarse tratamiento de primera línea y como condición *sine qua non* para que podamos realizar luego otro tratamiento en el paciente con oclusión coronaria e infarto de miocardio.

S. ERILL: ¿Se han hecho estudios con hipoxia en la reperfusión?

D. GARCÍA-DORADO: Se han hecho, lo que ocurre es que en realidad no se trata de reperfusión, ya que las arritmias aparecen en el momento de restaurar el flujo o en el momento de restaurar el oxígeno y la respuesta es muy local y poco trascendente. Lo que sí es importante es que desde hace mucho tiempo se han realizado esfuerzos modificando las condiciones de reperfusión, y esto en el campo de la cirugía cardiovascular se ha aplicado desde hace tiempo de manera empírica (en el campo de la cardiología se ha aplicado menos). Ocurre que el paradigma de por qué las células se mueren ha cambiado. Primero se discutía si las células podían morir en el momento de la reperfusión o si podían estar ya muertas. Esto ocurría en parte porque los experimentos que se hacían para evitar la muerte celular no eran muy claros. El mecanismo de muerte no estaba claro y se pensaba que los radicales libres del oxígeno eran el factor crítico. Ahora, gracias al trabajo de muchos grupos durante muchos años, hemos llegado a la conclusión de que los radicales libres ejercen un papel que puede ser importante en determinados aspectos de todo este complicado y demostrado esquema, pero que no son el único factor. Se pueden corregir otros factores para salvar células que de otra manera iban a morir. La isquemia produce acidosis y la normalización del pH rápida durante la reperfusión es tremendamente deletérea. Si se logra hacer que sea más progresiva y más tardía se obtienen claros beneficios terapéuticos. Por tanto, lo que hace falta es desarrollar fármacos que sean capaces de hacer esto a través de las vías más adecuadas.

Investigación en hematología: metilación del ADN como factor pronóstico en pacientes con leucemia aguda linfoblástica

M. Barrios García*, J. Román Gómez**, A. Jiménez Velasco*, A. Torres** y A.I. Heiniger*

*Servicio de Hematología, Hospital Carlos Haya, Málaga.

**Servicio de Hematología, Hospital Reina Sofía, Córdoba.

Introducción

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es la variedad más frecuente de leucemia aguda y el tipo de neoplasia de mayor prevalencia en los niños. Se trata de una leucemia de relativamente buen pronóstico, con una supervivencia libre de enfermedad de hasta el 80% a los 5 años en niños sin factores de riesgo, aunque estas cifras se reducen de forma importante en pacientes adultos o cuando se añaden factores de mal pronóstico¹.

En este sentido, es bien conocida la influencia sobre la supervivencia de la edad, el número elevado de células al diagnóstico, las características inmunofenotípicas, la asociación de determinadas alteraciones genéticas (especialmente el reordenamiento bcr-abl o las alteraciones de la región 11q23) o la respuesta al tratamiento^{2,3}.

Con la LAL se han asociado múltiples alteraciones citogenéticas y moleculares, afectando a diferentes mecanismos de activación/inactivación genética. Se han descrito alteraciones moleculares en la apoptosis⁴ o en la adhesividad celular⁵ así como otras relacionadas con la proliferación tumoral, que acontecen en el ciclo celular⁴⁻⁷. Entre éstas, p21 es una proteína de la familia de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina, que se activa a partir de p53, y detiene el paso desde la fase G0 a la fase G1 del ciclo celular en células dañadas o neoplásicas facilitando la apoptosis⁸. En modelos *in vitro*, p21 se ha mostrado capaz de inhibir la proliferación tumoral⁹ y, en algunas líneas celulares leucémicas tanto mieloides como linfoides, la expresión de p21 se encuentra disminuida^{10,11}. Este descenso de actividad de p21, como la mayor parte de las alteraciones observadas en la LAL, no parece deberse a mutaciones, translocaciones o pérdidas de heterocigosidad¹², por lo que se han propugnado para explicarlas mecanismos epigenéticos de regulación del genoma, entre los que destaca la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN)¹³.

Proceso de metilación del ADN

El proceso de metilación tiene lugar en los nucleótidos de citosina (C) de las células eucariotas que se transforman en 5'-metil-citosina (5-m-C) por acción de diversas metiltransferasas¹⁴. Este fenómeno sólo ocurre cuando la citosina precede a la guanina en forma de dinucleótidos CpG (citosina-fosfato-guanina), los cuales se encuentran ampliamente distribuidos por el genoma, pero se concentran de forma característica en determinadas zonas conocidas como "islas CpG", especialmente susceptibles de ser metiladas. Las islas CpG suelen disponerse en las regiones promotoras de gran número de genes y habitualmente se hallan desmetiladas, permitiendo la normal transcripción del gen¹⁴.

Consecuencias y funciones fisiológicas de la metilación del ADN

Sin embargo, cuando las regiones promotoras se metilan, la transcripción normal de los genes implicados resulta inhibida, produciendo lo que se conoce como silencio transcripcional^{15,16}. Varios mecanismos se han propuesto para explicar cómo se bloquea la transcripción génica, incluyendo el bloqueo directo de la fijación de factores transcripcionales por la presencia de los grupos metilo, o de forma indirecta debido a la mayor afinidad de la 5'-m-C por proteínas fijadoras de deacetilasas de histonas, o mediante la organización de cromatina inactiva alrededor de las islas CpG metiladas¹⁴⁻¹⁶.

En cualquier caso, tanto la metilación como el silencio transcripcional que genera cumplen una misión fisiológica inactivando regiones del genoma cuya transcripción puede resultar perjudicial para la célula^{14,15}. De este modo la metilación permite inactivar secuencias parásitas del ADN (procedentes de virus, de trasposomas, etc.), silenciar regiones del cromosoma X, reorganizar los estados activo e inactivo de la cromatina, blo-

quear la expresión de genes en determinados tejidos, o permitir el *imprinting* génico^{14,15}.

Papel de la metilación en el desarrollo tumoral

No obstante, los procesos de metilación pueden ocurrir de forma anómala o en genes promotores inadecuados, lo que se puede traducir en la aparición de procesos patológicos. De hecho, se han descrito trastornos de la metilación de diversos genes en las células neoplásicas de casi cualquier estirpe, incluyendo la LAL¹⁶⁻¹⁸.

En la patogenia de los tumores, la metilación puede intervenir tanto por exceso como por defecto. La hipometilación puede contribuir al desarrollo de tumores al permitir la transcripción de oncogenes normalmente silenciados de forma fisiológica. Del mismo modo, zonas cromosómicas inactivadas por metilación pueden perderse durante la segregación si el nivel de metilación está disminuido¹⁵⁻¹⁷. La hipermetilación, por su parte, favorece la aparición de mutaciones espontáneas por desaminación transformando la 5-m-C a timina^{14,16}. Sin embargo, el mecanismo oncogénico mejor conocido es el silencio transcripcional por hipermetilación de genes supresores, que implica el bloqueo de expresión de éstos y, por tanto, facilita el crecimiento tumoral¹⁷⁻²¹. En este apartado se podría incluir la hipermetilación de la región promotora de p21.

Hipótesis de trabajo

Nuestro planteamiento partiría de que la metilación de determinados genes supresores, en particular p21, se va a encontrar aumentada en pacientes con LAL, disminuyendo su expresión y condicionando la evolución de la enfermedad.

Material y métodos

Sujetos de estudio

Se analizaron 124 pacientes con diagnóstico de LAL. Para ello se recogieron muestras de médula ósea de los pacientes en el momento del diagnóstico y se realizó la extracción de ADN y ácido ribonucleico (ARN). Treinta médulas óseas sin alteraciones fueron usadas como controles.

Determinación del grado de metilación

Diversas técnicas se han empleado para detectar metilación del ADN¹⁵. Entre ellas, la digestión con enzimas de restricción sensibles a la me-

tilación ha sido progresivamente sustituida por otras basadas en la desaminación de la citosina por bisulfito sódico²². Con esta técnica, las muestras de ADN se incubaban con bisulfito, transformando las bases de citosina no metiladas en uracilos. A diferencia de las citosinas no metiladas, las metiladas se encuentran protegidas de la acción del bisulfito. Posteriormente, en todos los casos se realizaba una amplificación diferencial de las secuencias metiladas y no metiladas de la región promotora de p21 mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y el producto amplificado se sometía a electroforesis en un gel de agarosa^{22,23}. Se comparó el grado de metilación con el de sujetos sanos y con el de un ADN comercial metilado en todos sus genes.

Expresión de ARNm de p21

Tras la extracción en fresco de ARN de las muestras, se determinó su nivel de expresión de p21, con el objetivo de correlacionarlo con el grado de metilación. Para ello, se realizaba una retrotranscripción del ARN transformándolo en ADNc y a continuación una PCR específica para amplificar p21²³. Simultáneamente, se determinaba un gen de referencia (RAR α), que se utilizaba como control de la integridad de la muestra.

Resultados

Grado de metilación y nivel de expresión de p21

Los sujetos controles mostraron un cierto grado de metilación de la región analizada que se consideró como nivel basal (ratio con β -actina entre 0,4 y 0,8). En comparación con este nivel, un 41% de los pacientes con LAL mostró un incremento del grado de metilación de p21 (más de 3 desviaciones por encima del nivel basal) (fig. 1A). La hipermetilación de p21 se asoció, como era de esperar, a un descenso de la expresión del ARNm del gen en estos pacientes (fig. 1B).

Supervivencia en pacientes con leucemia aguda linfoblástica en función del grado de metilación

Los sujetos con hipermetilación de p21 mostraron una menor supervivencia libre de enfermedad (59 frente a 6%) y una menor supervivencia global (65 frente a 8%), con un seguimiento de 7 y 9 años, respectivamente, que aquellos no hipermetilados (fig. 2A y B). Estas diferencias se ob-

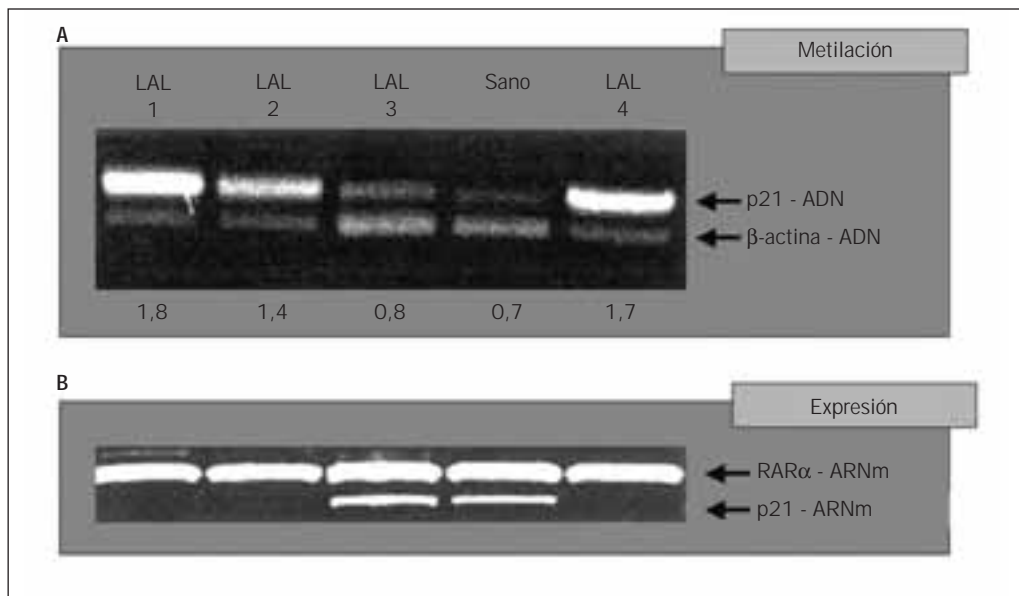


Fig. 1A y B. A) Grado de metilación de la región promotora de p21 en una médula ósea sana y en 4 pacientes de leucemia aguda linfoblástica (LAL). En todos los casos se observó metilación de p21, por lo que se realizó una cuantificación relativa con respecto a un gen control (β -actina), el cual se amplificó simultáneamente. Los valores de la ratio p21/ β -actina se representan para cada caso en la parte inferior de la figura. En los casos LAL 1, 2 y 4, el grado de metilación superó en más de 3 DS el observado en los controles, por lo que se consideró que p21 se encontraba hipermetilado. LAL 3 no mostró diferencia de metilación con respecto a la médula sana. B) Nivel de expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de p21 en los mismos sujetos representados en A. Como se puede observar, p21 no se expresó en los pacientes con hipermetilación de la región promotora, haciéndolo de forma normal en el sujeto sano y en el paciente no hipermetilado. La banda superior, presente en todas las muestras, corresponde al gen RAR α , que se empleó como referencia de la integridad del ARNm.

servaron tanto en niños como en adultos, y no se relacionaron con ninguno de los factores pronósticos habitualmente utilizados para LAL (edad, hiperleucocitosis, inmunofenotipo, citogenética). De hecho, el análisis multivariante demostró que la metilación de p21 constituye un factor pronóstico independiente y con mayor potencia estadística que la mayoría de los conocidos para la evolución de la LAL.

En posteriores estudios se ha ampliado el número de genes analizados (hasta 15) y las vías metabólicas implicadas (ciclo celular, apoptosis, diferenciación o adhesividad), con el objetivo de comprobar si el patrón de metilación en sí, en lugar de la actuación específica de algunos genes, determinaba el pronóstico de la LAL. Los resultados demuestran que sólo un 23% de los pacientes no tenían ningún gen metilado, lo que se asociaba con una mayor supervivencia (fig. 3A y B). El nivel de metilación, analizado en función del

número de genes metilados, determinaba tanto la supervivencia libre de enfermedad como la supervivencia global en estos pacientes, y constituía una de las principales variables pronósticas en el análisis multivariante.

Conclusiones

Un amplio grupo de pacientes con LAL muestra hipermetilación del gen supresor p21 que se asocia con disminución de la expresión de dicho gen.

La hipermetilación de p21 constituye un factor de riesgo independiente en pacientes con LAL y se asocia a un descenso de la supervivencia libre de enfermedad y de la supervivencia global.

La metilación del ADN, como proceso asociado a la LAL, representa un factor pronóstico negativo independiente y de gran potencia en estos pacientes.

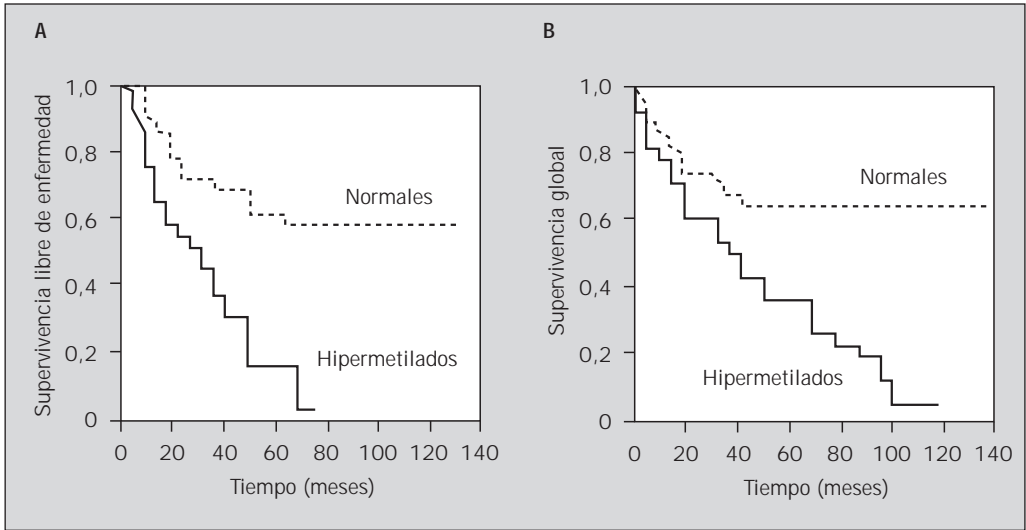


Fig. 2A y B. A) Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con leucemia aguda linfoblástica en función del grado de metilación de p21. Los pacientes hipermetilados muestran una supervivencia significativamente menor que los que presentaban un grado de metilación normal. B) Supervivencia global en los mismos pacientes. Se puede observar una mortalidad significativamente superior en los pacientes hipermetilados con respecto a los que mostraban un nivel normal de metilación de p21.

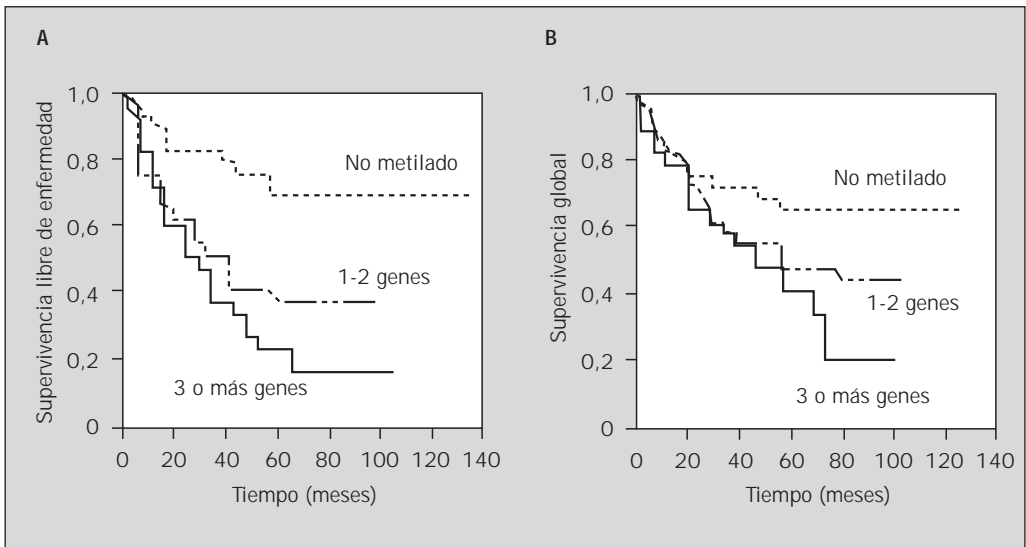


Fig. 3A y B. A) Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con leucemia aguda linfoblástica en función del número de genes metilados. Los pacientes sin genes metilados muestran una supervivencia significativamente mayor que los que tienen algún gen metilado. Dentro de éstos, el pronóstico empeora a medida que el número de genes metilados aumenta. B) Supervivencia global en los mismos pacientes. La mortalidad es significativamente menor en los pacientes sin metilación frente a aquellos con 1 o 2 genes metilados, los cuales también muestran mayor supervivencia que los que presentan 3 o más genes metilados.

Discusión

Considero que el proyecto presentado, realizado en estrecha colaboración con la Unidad de Biología Molecular del Servicio de Hematología del Hospital Reina Sofía de Córdoba, cuyo responsable es el Dr. Román Gómez, representa de forma adecuada cómo se pueden relacionar la investigación básica y la medicina clínica. En éste se hace converger una hipótesis molecular con sus consecuencias a nivel clínico. Esto requiere un detallado análisis de los fundamentos moleculares de la enfermedad y el empleo de técnicas de laboratorio no sistemáticas; pero, a la vez, obliga a una recogida cuidadosa de muestras de pacientes y a conocer de cerca su evolución.

En este sentido, la hematología, a diferencia de otras especialidades, abarca tradicionalmente tanto el cuidado de pacientes como su estudio en el laboratorio; y, por tanto, establece de forma más espontánea la relación entre los dos apartados. En este contexto la investigación básica y su integración con la clínica es probablemente menos sorprendente que en otros ámbitos. Habría que destacar que el laboratorio de hematología se desarrolla para dar cobertura a unos pacientes muy distintos (desde la coagulación hasta la oncohematología, o desde la hemoterapia al trasplante de órganos), pero también extraordinariamente demandantes en cuanto a la búsqueda de soluciones, por su gravedad o por su complejidad (pensemos en los pacientes trasplantados, pediátricos, hemofílicos, oncológicos, etc.). Esto conlleva la continua generación de hipótesis y la extensión de la tecnología para los estudios más básicos (ahí están las *stem cell*, los trasplantes de cordón, los estudios citométricos o moleculares), pero también su más inmediata aplicabilidad práctica (las infusiones de linfocitos, los Acs monoclonales, los inhibidores de la tirosinasa). La integración de los dos aspectos puede observarse igualmente en las revistas de la especialidad, en los congresos y reuniones de ésta, o en la formación de los residentes.

Laboratorio de biología molecular en hematología

También en este contexto se enmarca la Unidad de Biología Molecular, que en nuestro servicio tiene una vida relativamente corta (unos 6-7 años), pero que ha crecido de forma exponencial, y cuyo responsable es el Dr. Jiménez Velasco. La unidad se crea nuevamente como una forma de proporcionar soporte a las necesidades de nuestros pacientes, especialmente oncológicos, que

no pueden ser asumidos por otros servicios generales dada la velocidad de desarrollo de estas técnicas (marcadores tumorales, quimerismo postrasplante, etc.). Tales estudios requieren alguien próximo a la hematología y con amplia dedicación para su puesta en marcha. Este trabajo asistencial es el que ha permitido la optimización de técnicas y la ampliación del campo de estudio para posteriormente ser aplicado a la investigación. Sin embargo, presenta el inconveniente de la escasa formación en estas materias, que obliga en muchas ocasiones a funcionar de forma autodidacta, aprendiendo en gran medida por ensayo y error.

Actualmente, el laboratorio está compuesto por una técnico de laboratorio, un biólogo becario posdoctoral, un médico especialista investigador y un médico especialista de plantilla, responsable del grupo. Naturalmente, las necesidades asistenciales ocupan la mayor parte de la jornada, y las limitaciones de tiempo y de personal (por no citar las económicas) se suplen con dedicación extra y mediante colaboraciones con otros grupos y otros hospitales, coordinando las técnicas para permitir economizar tiempo, dinero y personal. Estas colaboraciones han sido especialmente fructíferas con el grupo de Córdoba (Dr. Román) y con los hospitales Gregorio Marañón de Madrid y la Clínica Universitaria de Navarra.

Líneas de trabajo

Además de la línea sobre el "papel de la metilación de genes en la oncogénesis y el pronóstico de neoplasias hematológicas", nuestro grupo desarrolla también una línea, con financiación FIS coordinada con el Hospital Gregorio Marañón, sobre "quimerismo hematopoyético mediante PCR cuantitativa en tiempo real en pacientes sometidos a trasplante alogénico por leucemia aguda" y otras sobre "mecanismos moleculares de la respuesta a fármacos en pacientes oncohematológicos".

Tanto el trabajo presentado como las líneas mencionadas demuestran que es posible y útil, aunque actualmente no sea un camino fácil, realizar investigación básica en el ámbito clínico; y habría que animar a las generaciones futuras a ampliar y mejorar este aspecto de su formación y del ejercicio de su actividad médica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pui C-H, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998;339:605-15.

2. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996;14(1):18-24.
3. Nakamura M, Sugita K, Inukai T, Goi K, Iijima K, Tezuka T, et al. p16/MTS1/INK4A gene is frequently inactivated by hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 translocation. *Leukemia* 1999;13:884-90.
4. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411:342-8.
5. Wijnhoven BPL, Dinjens WNM, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 2000;87:992-1005.
6. Roman-Gomez J, Jimenez A, Castillejo JA, Agirre X, Barrios M, Navarro G, et al. Promoter hypermethylation of cancer-related genes is a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004 (en prensa).
7. Agirre X, Novo FJ, Calasanz MJ, Larrayoz MJ, Lahortiga I, Valganon M, et al. TP53 is frequently altered by methylation, mutation, and/or deletion in acute lymphoblastic leukaemia. *Mol Carcinog* 2003;38:201-8.
8. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:1169-74.
9. Chen YQ, Cipriano SC, Arenkiel JM, Miller FR. Tumor suppression by p21WAF1. *Cancer Res* 1995;55:4536-9.
10. Delgado MD, Vaque JP, Arozarena I, Lopez-Illasca MA, Martinez C, Crespo P, et al. H-, K- and N-Ras inhibit myeloid leukemia cell proliferation by a p21WAF1-dependent mechanism. *Oncogene* 2000;19:783-90.
11. Naujokat C, Sezer O, Zinke H, Leclere A, Hauptmann S, Possinger K. Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells. *Eur J Haematol* 2000;65(4):221-36.
12. Shiohara M, El-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, et al. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 1994;84:3781-4.
13. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21 (WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res* 1999;246:280-9.
14. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* 1999;93:4059-70.
15. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-54.
16. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetic joints genetics. *Trends Genet* 2000;16:168-74.
17. Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, Barrios M, Heiniger A, Torres A. The role of DNA hypermethylation in the pathogenesis and prognosis of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Lymph* 2003;44:1855-64.
18. Garcia-Manero G, Daniel J, Smith TL, Kornblau SM, Lee MS, Kantarjian HM, et al. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8(7):2217-24.
19. Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, Cervantes F, Boque C, Hermosin L, et al. Cadherin-13, a mediator of calcium-dependent cell-cell adhesion, is silenced by methylation in chronic myeloid leukemia and correlates with pretreatment risk profile and cytogenetic response to interferon alfa. *J Clin Oncol* 2003;21:1472-9.
20. Kawano S, Miller CW, Gombart AF, Bartram CR, Matsuo Y, Asou H, et al. Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood* 1999;94:1113-20.
21. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Barrios M, Andreu EJ, et al. The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 19q13.3-4, is downregulated by hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18:362-5.
22. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-6.
23. Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, González MG, Moreno F, Rodríguez MC, et al. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21CIP1/WAF1/SDI1 gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:2291-6.

DISCUSIÓN

D. GARCÍA-OLMO: ¿Existe alguna herramienta clínica para evitar la hipermetilación o para mejorar en este aspecto?

M. BARRIOS: Existen fármacos, como la 5-aza-citidina o la 5-aza-deoxicitidina, capaces de disminuir la metilación. Se dispone tanto de datos *in vitro* como *in vivo* pero con resultados que no son totalmente satisfactorios. Parece que fun-

cionan mejor *in vitro*, puesto que *in vivo* se producen efectos tóxicos asociados probablemente al hecho de que se trata de fármacos no específicos que actúan sobre un proceso muy generalizado como es la metilación. Se sigue trabajando en esta línea y se trabaja también en líneas ligadas a la hipermetilación y al silencio transcripcional, el cual parece que no depende sólo de la acción de la metiltransferasa sino

también de la acetilación de histonas y de otra serie de componentes en los que es fácil que podamos encontrar dianas terapéuticas. Lo difícil probablemente será desarrollarlas.

D. GARCÍA-OLMO: Observando las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia a uno se le debe quedar muy mala cara cuando ve que un paciente está hipermetilando p21. ¿Cambiáis vuestra actitud clínica en estos pacientes?

M. BARRIOS: Se trata de datos todavía muy recientes. No se han incluido aún en nuestros protocolos clínicos y terapéuticos, mientras que los factores de riesgo que comentaba al principio sí que están incluidos. Probablemente la metilación o algún tipo de variable de ese tipo deberán incluirse también en los protocolos en un futuro. La actitud clínica en estos casos casi siempre consiste en utilizar terapias más agresivas para pacientes de más riesgo. Ahora mismo sabemos que los pacientes hipermetilados deberían entrar en los grupos de más riesgo y recibir terapias más agresivas.

F. SORIGUER: ¿Hay factores ambientales que modulen la metilación o es sólo un proceso endógeno?

M. BARRIOS: Es un proceso de regulación génica. La metilación es un proceso estable pero muy dinámico, que está activándose y desactivándose continuamente. De hecho, la metilación es responsable de que determinados genes se transcriban solamente en determinados tejidos y no en otros, o de que en la segregación de los

cromosomas se segreguen unas partes y no otras, o de que se puedan inactivar determinados genes y no otros. Por tanto, la metilación, al ser un proceso dinámico, está sometida a todos los agentes ambientales que pueden producir daño genético. Sin embargo, es mal conocida la génesis de la metilación. Es un proceso sobre el que tenemos muy poco control. Sabemos cuándo ocurre y sabemos que podemos modificarlo, pero no tenemos control sobre qué se está produciendo, qué lo puede generar o dónde se pueden producir esas alteraciones que luego dan origen a las células tumorales.

Y. ÁLVAREZ: ¿Se sabe si la mutación del p21 y del p53 es por hipermetilación?

M. BARRIOS: Los conceptos de mutación y de metilación son independientes. El concepto de mutación implica una alteración de la secuencia génica, de la estructura del ADN, mientras que en la metilación no hay alteración de la secuencia. Lo que hay es una alteración de la transcripción del gen. Parece que mutación y metilación están muy ligadas en las células tumorales, porque muchas veces las consecuencias son las mismas. El p53, cuando se muta, produce una proteína que no es funcional y cuando se hipermetila p21 se produce la ausencia de su proteína, con lo que al final la consecuencia biológica viene a ser la misma, pero se trata de conceptos totalmente diferentes. En cualquier caso, se desconoce si concretamente las mutaciones de p53 pueden deberse o en qué porcentaje a estados de hipermetilación previos.

Mejora de la integración ósea de los implantes dentales, prótesis y placas de osteosíntesis mediante un nuevo tratamiento de superficie: implantación iónica

M.A. de Maeztu*, J.I. Álava**, I. Braceras*** y C. Gay-Escoda****

*Práctica privada de Estomatología, Tolosa, Guipúzcoa.

**Centro Tecnológico Fundación Inasmet, San Sebastián.

***Lifenova Biomedical, San Sebastián.

****Facultad de Odontología, Universidad de Barcelona.

Introducción

La necesidad de tratamientos protésicos implantosportados de larga duración es cada vez más habitual en la práctica clínica diaria.

La utilización de estos sistemas de sustitución protésica se acompaña de un porcentaje de fallo del implante nada despreciable, significando, a veces, la imposibilidad de recurrir de nuevo a esta técnica.

Los procedimientos experimentales utilizados con éxito para mejorar la osteointegración de los implantes dentales se han limitado a variaciones en el diseño y a tratamientos de superficie.

Numerosos autores¹⁻⁷ han demostrado que los implantes con la superficie tratada presentan una unión a hueso mejor que aquellos simplemente mecanizados.

Los diferentes tratamientos que se han utilizado de manera experimental pueden agruparse en tres apartados⁸:

1. *Adición de material.* Proyección de plasma de titanio; recubrimiento con hidroxiapatita.

2. *Sustracción de material.* Mediante chorreao con partículas y/o grabado ácido.

3. *Modificación del material.* Es posible modificar la superficie de los implantes sin añadir ni eliminar material. Disponemos de tres técnicas, fundamentalmente:

3a. Tratamiento térmico con cañón de electrones.

3b. Tratamiento mediante láser.

3c. Implantación iónica⁹⁻¹².

En el presente trabajo realizamos una valoración histomorfométrica de la osteointegración de implantes dentales de uso clínico tratados en superficie mediante implantación iónica¹³. Con dicho tratamiento pretendemos la modificación de su estructura superficial a fin de mejorar la interacción de dicha superficie con las moléculas biológicas del entorno de una manera íntima y duradera^{14,15}.

Valoramos, así mismo, las posibles diferencias cuantitativas, en cuanto a porcentaje de contacto hueso-implante (%CHI), entre el titanio comercialmente puro (Ticp) y el Ti6Al4V, entre implantes tratados y controles, entre los diferentes tratamientos iónicos y entre las zonas de inserción de los implantes en hueso (zonas de mayor o menor densidad ósea).

Material y método

Técnica de implantación iónica

La implantación iónica es una tecnología de alto vacío que puede realizarse a temperaturas controladas. Consiste en bombardear una superficie con iones previamente seleccionados y acelerados a altas velocidades. Los iones disrumpen la superficie del material gracias a la alta energía cinética con que son propulsados, penetrando en su red atómica y quedando atrapados en ella, lo que implica modificaciones de las capas más superficiales. La zona implantada forma parte integral del material, evitando los riesgos de delaminación de los revestimientos. No supone pérdida alguna del material de base, lo que resulta ventajoso respecto a las técnicas de sustracción.

Las mejoras que podemos obtener mediante estos cambios de la superficie son de tipo mecá-

El contenido de este capítulo procede, en parte, del artículo publicado en Clin Oral Implants Res 2003;14:57-62.

nico (mayor resistencia al desgaste y a la fricción, mayor dureza del material)^{6,15-18}, de tipo químico (mayor resistencia a la corrosión, menor lixiviación)^{19,20}, electroquímico (mayor estabilidad iónica)²¹ y biológico (mayor adsorción tisular)²²⁻²⁴.

Es una técnica muy versátil, permitiendo seleccionar los tipos de iones con los que efectuar el tratamiento en función de las características que deseemos modificar.

En definitiva, se trata de un proceso limpio, versátil, altamente controlable y reproducible, que produce modificaciones intrínsecas de las capas más superficiales, respetando la estructura y características del material de base.

Implantes seleccionados y grupos de tratamiento

Previamente, realizamos un análisis estructural de diversos implantes comerciales a fin de asegurarnos la pureza, en cuanto a su composición química, de aquellos a seleccionar²⁵.

Utilizamos 88 implantes dentales comerciales, 44 de Ticip (Impla-Med-Sterngold™, Sunrise, FL, EE.UU.) y 44 de Ti6Al4V (Sulzer Calcitek Inc.™, Carlsbad, CA, EE.UU.). Para cada tipo de composición metálica (Ticip y aleación) se hicieron cinco grupos de ocho implantes cada uno. Uno de los grupos de cada material quedó sin tratamiento, como control. El segundo grupo fue tratado mediante la implantación de iones CO⁺. El tercero, mediante ión nitrógeno (N⁺). El cuarto, mediante ión carbono (C⁺). Finalmente, el quinto se trató con ión neón (Ne⁺); en este caso, debido a la escasa reactividad química, en principio, de dicho ión y que, sin embargo, producía un incremento de la reactividad superficial en el titanio²⁶, se le introdujo a continuación en una solución proteica (colágeno), grupo que se denominó neón-colágeno (Ne+Col). Los tratamientos sobre los implantes se hicieron mediante un implantador iónico Danfysik® serie 1090, con una energía entre 50 y 200 keV, durante 10 minutos, promedio.

Animales, anestesia y técnicas quirúrgicas

Utilizamos 22 conejos albinos tipo Nueva Zelanda, con un peso medio de 4.700 g. Dos de ellos fallecieron tras la intervención quirúrgica. Cuatro implantes de cada material se perdieron con los dos conejos fallecidos.

La anestesia se realizó con clorhidrato de tiacina (3,5 mg/500g i.m.) y ketamina (18 mg/500 mg i.m.), completándose a nivel local con lidocaína 1:100.000, 1 ml en cada pata.

En el medio estéril del quirófano experimental se procedió a la inserción de dos implantes dentales en cada una de las dos mesetas tibiales del conejo, siguiendo el protocolo establecido y según la técnica aconsejada por las casas comerciales.

Se hizo profilaxis antibiótica con penicilina benzatina (50 x 10³ UI/kg/semana i.m.) y desinfección de la zona quirúrgica con povidona yodada. Los días siguientes a la intervención quirúrgica se administró tratamiento analgésico con acetil salicilato de lisina (10 mg/500 g i.m.) y limpieza de las heridas quirúrgicas con clorhexidina (0,12%). Los puntos cutáneos de seda 3/0 se retiraron a los 10 días.

Los conejos permanecieron durante 3 meses en jaulas individuales automáticas, en medio controlado de luz y temperatura, período tras el cual fueron sacrificados en cámara de monóxido de carbono, previa sedación con diacepán (5 mg/kg i.m.), procediéndose a la extracción de las mesetas tibiales en bloque que contenían los implantes.

Preparación de los especímenes

Se procedió a la valoración visual y radiográfica de los bloques óseos, apreciando las posibles zonas de lisis o, por el contrario, de sobrecrecimiento óseo periimplantarias. En el laboratorio realizamos la preparación de los cortes histológicos siguiendo la técnica de separación, corte y pulido fino de Donath²⁷. Obtuvimos 320 cortes de 50 μ de espesor, de los cuales seleccionamos los dos mejores por implante desde el punto de vista macroscópico. Estos 160 cortes fueron sometidos al proceso de tinción, utilizando las técnicas de Martins y de Masson.

Análisis histomorfométrico

La valoración del %CHI de las preparaciones histológicas la efectuamos mediante microscopía de luz, previa captura de las imágenes con un sistema de macrofotografía digital (Nikon™) y un analizador de imágenes Omnimet®.

Microscopía electrónica de barrido y microsonda de electrones

Algunas de las muestras fueron estudiadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) mediante un microscopio JEOL JXA-8600 con microsonda de electrones (EDS) a fin de valorar las áreas de calcio en contacto con implantes tratados y controles.

Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS)

Esta técnica consiste en irradiar la muestra con rayos X blandos, analizando la energía de los electrones emitidos. Como cada elemento tiene una distribución energética de orbitales particular, es posible la identificación de los elementos presentes en las primeras capas atómicas. A fin de analizar el tipo de unión que se establece entre el hueso y el implante, cinco de las muestras tratadas fueron sometidas a este tipo de estudio.

Estadística

Los valores, expresados en %CHI, fueron procesados estadísticamente mediante una hoja de cálculo. Para el estudio estadístico a doble ciego utilizamos el método ANOVA y la "t" de student para los grupos reducidos (dos series apareadas).

Resultados

Valoración histomorfométrica

Comparación según la densidad ósea. La media de %CHI para ambos materiales insertados en la epífisis tibial fue del 74,44%, mientras para los colocados en la metáfisis fue del 55,73%.

Implantes colocados en la zona epifisaria. No se apreciaron diferencias estadísticamente sig-

nificativas entre los diferentes grupos de tratamiento y los controles insertados en la zona epifisaria, siendo el %CHI muy elevado en todos los casos, tanto para el Ticp como para el Ti6Al4V.

Implantes colocados en la zona metáfisaria.

Para los implantes colocados en la metáfisis, el %CHI de los implantes de Ticp no tratados fue del 43,31%, mientras que ascendía al 55,08% para aquellos del mismo material tratados mediante implantación iónica, en su conjunto. En el caso del Ti6Al4V, el grupo control obtuvo una media de %CHI del 52,04%, aumentando hasta el 60,72% de media para los implantes tratados, en conjunto.

Los resultados, expresados en %CHI, obtenidos para cada grupo de tratamiento mediante los diferentes iones en cada uno de los dos materiales, colocados en la metáfisis tibial, se expresan en las figuras 1 y 2.

Diferencias según materiales. La media de %CHI para el Ticp en conjunto, tratados más controles, fue del 52,72%, mientras que para el Ti6Al4V fue del 58,89%.

En las figuras 3 a 6 podemos apreciar, tanto por microscopia de luz como por SEM, los cordones de hueso denso, de estructura laminar, que migran desde las diferentes zonas corticales hacia la superficie del implante tratado.

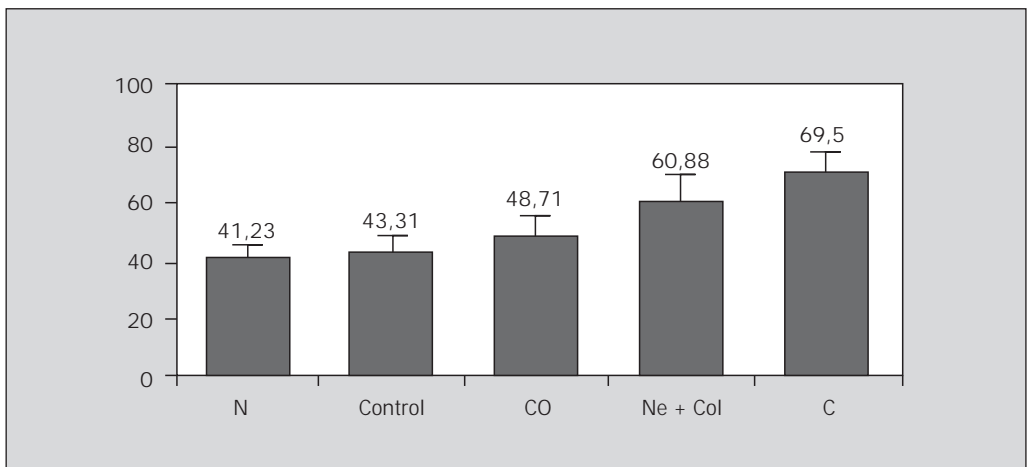


Fig. 1. Porcentaje de contacto hueso-implante para los diferentes grupos del Ticp insertado en la metáfisis.

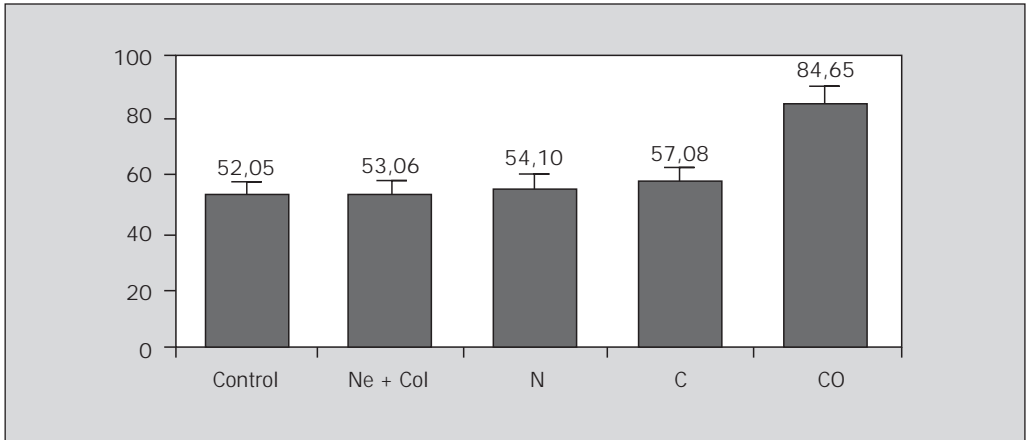


Fig. 2. Porcentaje de contacto hueso-implante para los diferentes grupos de Ti6Al4V insertado en la metafisis.

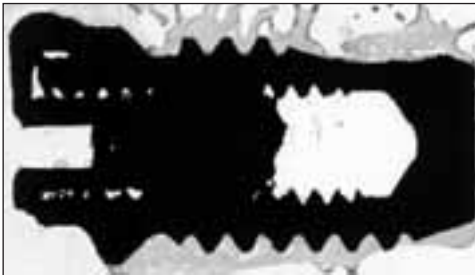


Fig. 3. Cordones de hueso denso migrados desde las corticales hasta la superficie del implante (tratado con CO⁺; Martins, x10).

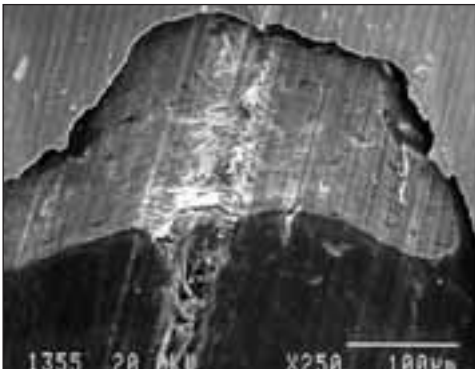


Fig. 4. Cordón óseo que forma hueso laminar en el fondo de una de las estriás del implante.

Valoración por microscopía electrónica de barrido y microsonda de electrones

Apreciamos, en primer lugar, el íntimo contacto que se produjo entre hueso e implante (fig. 7).

Al realizar densiometría de calcio apreciamos zonas de baja densidad no catalogadas como hueso en la microscopía de luz, que, sin embargo, el análisis por EDS valoró como tal, en proceso de calcificación (fig. 8).

En estas zonas, llevadas a mayores aumentos, pudimos observar la estructura ósea de éstas (figs. 9 y 10).

Análisis mediante espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS o ESCA)

Los elementos atómicos que se encontraban presentes en las primeras capas de interfase hueso-implante figuran en la tabla I.

La figura 11 corresponde a una magnificación del pico Ti 2p₃, donde se observa un pico de máxima energía (458,3 eV) situado entre el valor del óxido de titanio (TiO: 459) y el del titanio orgánico de síntesis (dicloruro de titanocenato: 457,2).

Discusión

El intento de realizar comparaciones válidas con otros estudios hitomorfológicos, efectuados con diversos tratamientos de superficie, resulta muy difícil, dadas las diferencias en las condiciones de su realización o de los parámetros utilizados en éstos para la valoración.

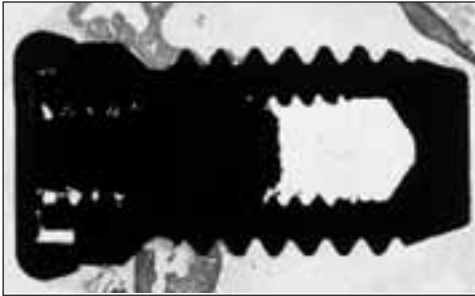


Fig. 5. Implante control. Sólo su tercio coronal (30% CHI), en contacto con la zona cortical, se encuentra rodeado de hueso denso (Martins, x10).

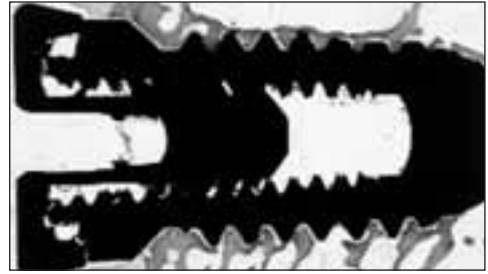


Fig. 6. Implante tratado mediante implantación de ión C⁺. El 90% de su superficie está rodeado de hueso denso que ha migrado (Martins, x10).

TABLA I
ELEMENTOS ATÓMICOS ENCONTRADOS,
MEDIANTE ANÁLISIS XPS,
EN LA INTERFASE HUESO-IMPLANTE,
EXPRESADOS EN SUS RESPECTIVOS
PORCENTAJES ATÓMICOS

Referencia	O	Ti	N	Ca	C	P	Na
71	36,7	10,9	1,5	2,7	42,7	3,9	1,8

No hemos encontrado en nuestra revisión bibliográfica ningún otro estudio histomorfométrico que utilice la implantación iónica como tratamiento de superficie.

Los valores obtenidos para los diferentes grupos de implantes colocados en la zona epifisaria fueron muy elevados para todos (74,44% de media), sin apreciarse diferencias significativas en ninguno de ellos.

Para los implantes colocados en la metafisis, la media de los valores fue del 55,73%, hallándose siempre valores más elevados para los grupos tratados mediante implantación iónica en conjunto respecto a sus controles, tanto para el TcP (55,08 frente a 43,31%) como para el Ti6Al4V (60,72 frente a 52,04%). Las diferencias en %CHI resultaron ser estadísticamente significativas al comparar los implantes de Ti6Al4V tratados mediante implantación iónica en conjunto frente al control de titanio comercialmente puro ($p = 0,028$).

Más concretamente, en el caso del TcP colocado en zona metafisaria, apreciamos un %CHI más elevado para los grupos tratados con Ne+Col (%CHI = 60,88%) que el obtenido con el grupo control (%CHI = 43,31%), siendo, además, el resultado estadísticamente significativo ($p = 0,03448$) para el grupo tratado con C⁺ (%CHI = 69,50%).

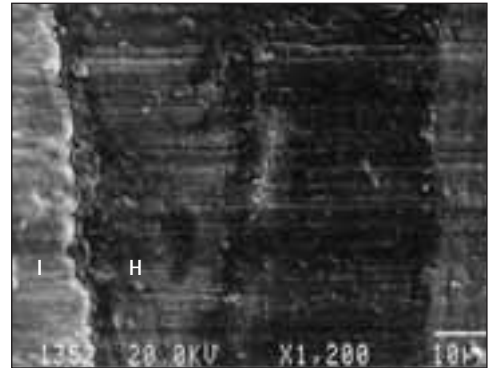


Fig. 7. Zona de íntimo contacto hueso (H)-implante (I).

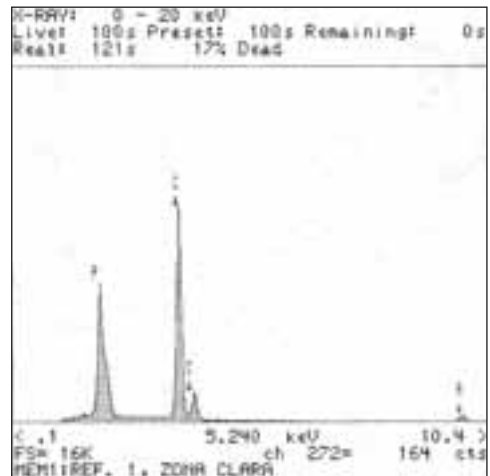


Fig. 8. Análisis EDS que confirma su naturaleza ósea.

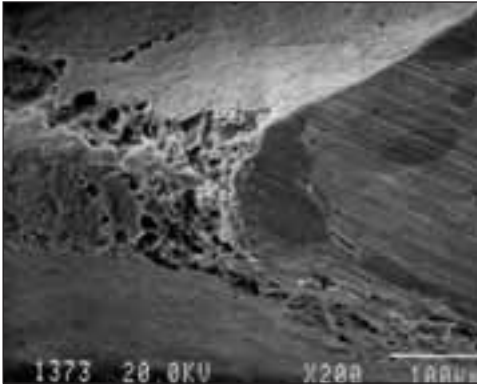


Fig. 9. Estría de hueso neoformado en proceso de calcificación.

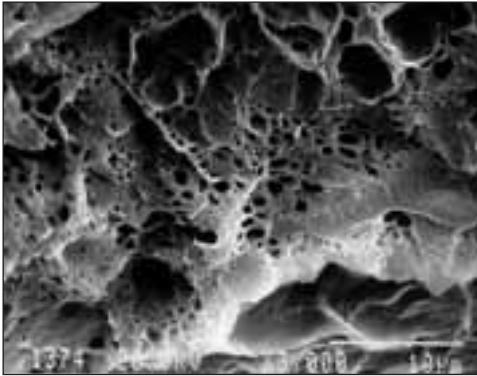


Fig. 10. Zona encuadrada de la figura 7 a 3.000 aumentos.

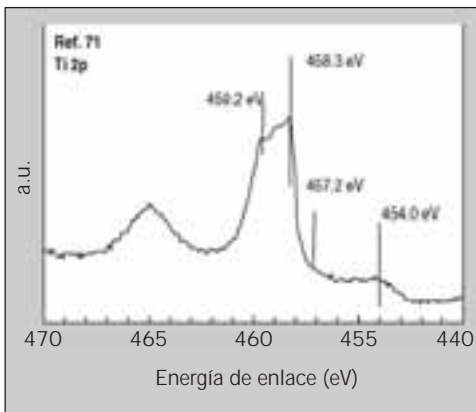


Fig. 11. Espectro de la interfase hueso-implante que muestra los diversos picos energéticos.

En cuanto a los implantes de la aleación Ti6Al4V colocados en la zona metafisaria, observamos para el grupo tratado con CO⁺ un %CHI = 84,65%, siendo el resultado estadísticamente significativo ($p = 0,0025$) respecto al control (%CHI = 52,05%).

No apreciamos diferencias estadísticamente significativas por el hecho exclusivo de tratarse de Ticp (valor medio de %CHI = 52,72%) o de Ti6Al4V (valor medio de %CHI = 58,89%).

Mediante el análisis por XPS pudimos averiguar la composición de los elementos atómicos presentes en las primeras capas de la interfase hueso-implante, así como el tipo de enlace que se crea entre el titanio tratado por implantación iónica y el tejido óseo al que se une.

Los elementos presentes en dichas capas (tabla I) correspondían a una estructura esperable mezcla de proteínas (CHON), cristales de polifosfato cálcico (POHCa), sales (Ca, Na) y óxido metálico (TiO).

En cuanto al tipo de unión implante-hueso, postulamos que se establece una unión de tipo enlace covalente entre los átomos de Ti-O-C para aquellos implantes tratados mediante la implantación de iones CO⁺. Cuando vemos de forma detallada el espectro energético correspondiente al titanio (pico Ti 2p3; fig. 9), observamos que el máximo de energía se halla a 458,3 (eV) de energía de enlace, que corresponde a un enlace Ti-O-C donde el carbono pertenece a una molécula orgánica compleja. Esta energía de enlace se encuentra sustancialmente separada de la del Ti metal (453,89 eV), del nitruro de titanio (455,8 eV) y del carburo de titanio (454,6 eV). Se halla situada entre los valores del óxido de titanio (TiO = 459 eV) y del titanio orgánico de síntesis (dicloruro de titanocenoato = 457,2 eV). Este enlace Ti-O-C presente en la interfase de la superficie del implante corresponde a la unión proteína-óxido metálico formada durante la permanencia del implante tratado en el animal vivo.

Lo importante de este hallazgo es que se trata de un tipo de unión más fuerte y estable que la unión que se establece mediante enlace iónico, propia del óxido de titanio y, por supuesto, mayor que la unión mediante fuerzas de Van der Waals.

Conclusiones

El presente estudio demuestra que el tratamiento de la superficie de los implantes dentales mediante implantación iónica mejora su osteointegración, no sólo de forma cuantitativa (mayor %CHI), sino, además, cualitativa (unión más fuerte y estable).

No apreciamos diferencias estadísticamente significativas por el simple hecho de tratarse de TiCp o de Ti6Al4V. Sin embargo, sí que existían según la densidad ósea de la zona de inserción de los implantes (epífisis-metáfisis tibial).

Las diferencias entre los tratados y controles se manifiestan especialmente en la metáfisis ósea, zona de baja densidad ósea, allí donde, precisamente, mayor interés tenemos en conseguir una mejora de la osteointegración. Dicha diferencia resulta estadísticamente significativa para la implantación con iones C^+ sobre el TiCp y CO^+ sobre la aleación Ti6Al4V.

Resulta evidente que las valoraciones histomorfométricas deben refrendarse con estudios paralelos de microscopía electrónica y espectroscopía de fotoelectrones. Los autores comprenden las dificultades inherentes a la aplicación de estas técnicas, pero creemos que los datos así obtenidos enriquecen el conocimiento de la relación implante-hueso.

Agradecimientos

Nuestro más sincero agradecimiento a todas las personas y entidades que han colaborado tanto en el trabajo de experimentación como en la redacción de este artículo: Plan Nacional I+D, proyecto Ref. MAT97-0903; Centro Tecnológico Fundación Inasmet; Departamento de Neurociencias de la Universidad del País Vasco; Unidad Experimental del Hospital Nuestra Señora de Arántzazu; Consejo General de Estomatólogos y Odontólogos de España.

A todos ellos, nuestro más profundo reconocimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thomas K, Cook S. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mater Res* 1985;19:875-901.
2. Carlsson L, Röstlund T, Albrektsson B, Albrektsson T. Removal torques for polished and rough titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988;3:21-4.
3. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991;25:889-902.
4. Gølfredsen K, Nimb L, Hjørting-Hansen E, Jensen JS, Holmén A. Histomorphometric and removal torque analysis for TiO₂-blasted titanium implants. An experimental study on dogs. *Clin Oral Impl Res* 1992;3:77-84.
5. Gølfredsen K, Wennerberg A, Johansson C, Tejl Skovgaard L, Hjørting-Hansen E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: An experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1223-31.
6. Wennerberg A. On surface roughness and implant incorporation. [Tesis doctoral] Göteborg, Suecia: University of Göteborg, 1996. p. 125.
7. Trisi P, Rao W, Rebaudi A. A histometric comparison of smooth and rough titanium implants in human low-density jawbone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:689-98.
8. Wagner WC. A brief introduction to advanced surface modification technology. *J. Oral Implants* 1992;18:231-5.
9. Banks BA, Weigand AJ, Babbush CA, Van Kampen L. Potentials biomedical applications of ion-beam technology. NASA Technical memorandum (NASA TM X-73512) Twelfth International Electric Propulsion Conference. Florida: noviembre de 1976.
10. Nath VC, Sood DK, Manory RR. Ultramicrohardness and microstructure of Ti 6Al 4V alloy nitrided by ion implantation. *Surface Coatings Technology* 1991;49:510-3.
11. Höhl F, Berndt H, Mayr P, Stock HR. Implantation of N₂, O and CO ions into titanium and Ti6Al4V. *Surface Coatings Technology* 1995;74-75:765-9.
12. García A, Vivente JL, Alonso F, Loinaz A, Oñate JI. Growth of carbon layers on Ti6Al4V alloy by very high dose carbon implantation. *Surface Coatings Technology* 1997;97:499-503.
13. Maeztu MA. Aplicación de los tratamientos de implantación iónica para la mejora de la biocompatibilidad del titanio y sus aleaciones. [Tesis doctoral] Leioa, España: Universidad del País Vasco, 2000. p. 104.
14. Sioshansi P. Medical applications of ion beam processes. *Nuclear Instruments Methods Physics Research* 1987;1319/20:204-8.
15. Alonso F, Arizaga A, Quaintons S, Ugarte JJ, Vivente JL, Oñate JI. Mechanical properties and structure of Ti6Al4V alloy implanted with different light ions. *Surface Coatings Technology* 1995;74-75:986-992.
16. Feller HG, Klinger R, Benecke W. Tribo-enhanced diffusion of nitrogen implanted into steel. *Material Science Engineering* 1985;69:173-80.
17. Mucha A, Braun M. Requisite parameters for optimal wear performance of nitrogen-implanted titanium and Ti6Al4V. *Surface Coatings Technology* 1992;50:135-9.
18. Hohmutz K, Richter E, Rauschenbach B, Blochwitz C. Fatigue and wear of metalloid-ion-implanted metals. *Mat Science Engineering* 1985;69:191-201.
19. Williams JM, Buchanan RA. Ion implantation of surgical Ti 6Al 4V alloy. *Mat Science Engineering* 1985;69:237-46.
20. Buchanan RA, Ridney ED, Jr., Williams JM. Ion implantation of surgical Ti 6Al 4V for improved resistance to wear-accelerated corrosion. *J Biomed Mater Res* 1987;21:355-66.

21. Palazzo U, Torrisi L, Rapisarda E. L'implantazione ionica in campo odontoiatrico. *Stomat Medit* 1988a;8:377-83.
22. Palazzo U, Rapisarda E, Torrisi L. Stidio sulle modificazioni stutturali indotte dalla impiantazione ionica sulle superfici funzional degli attachi per prote-si. *Stomat Medit* 1988;8:387-94.
23. Röstlund T, Thomsen P, Bjursten LM, Ericson LE. Differences in tissue response to nitrogen-ion-implanted titanium and titanium cp in the abdominal-wall of the rat. *J Biomed Mater Res* 1990; 24:847-860.
24. Cook SD, Anderson RC, Lavernia CJ. Histologic and microradiographic evaluation of textured and nontextured aluminium oxide dental implants. *Biomat Med Dev Art Org* 1983-84;11:259-69.
25. Maeztu MA, Gómez MA, Arévalo E, Alava JI, Alonso F. Análisis estructural de los principales sistemas de implantes utilizados en la actualidad. *Periodoncia* 1999;9:195-204.
26. Alonso F, Rinner M, Loinaz A, Oñate JI, Ensin-ger W, Rauschenbach B. Characterization of Ti6Al4V modified by nitrogen plasma immersion ion implantation. *Surface Coatings Technology* 1997;93:305-8.
27. Donath K, Bruner GA. A method for the study of undecalcified bones and theethwith attached soft tissues. *J Oral Pathol* 1982;11:318-26.
28. Braceras I, Alava JI, Oñate JI, Brizuela M, García-Luis A, Garagorri N, et al. Improved osseointegration in ion implantation treated dental implants. *Surface Coatings Technology* 2002;158-159:28-32.
29. Oñate JI, Braceras I, Goikoetxea L, Viviente JL, Alava JI, de Maeztu MA. Bone adhesion on ion implanted titanium alloy. 13th International Conference on SMMIB. San Antonio, TX-USA: septiembre de 2003. *Surface Coatings Technology* (2004) (en prensa).

DISCUSIÓN

S. VIDELA: ¿Disponéis de resultados clínicos de este nuevo tratamiento?

M.A. DE MAEZTU: No. Después del estudio que he presentado realizado con conejos, realizamos uno con perros Beagle, donde comparamos la implantación iónica no sólo con el titanio simplemente mecanizado, sino con los tratamientos de superficie más utilizados hoy día en clínica, en cuanto a implantes dentales se refiere. En este estudio, de nuevo la implantación iónica ha demostrado superioridad en cuanto al porcentaje de hueso unido al implante y a la rapidez en conseguirlo. Tenemos en proyecto el ensayo clínico, pero todavía no se ha realizado.

J.C. PASTOR: ¿El instituto en el que trabajáis se dedica a biomateriales?

M.A. DE MAEZTU: No en exclusiva. Inasmet es un centro tecnológico que nació por la unión de varias empresas del metal de Guipúzcoa que, en lugar de tener cada una su departamento de investigación, crearon este centro dedicado al análisis de materiales en el campo de la metalurgia. Con el tiempo, el Centro Tecnológico amplió sus proyectos de investigación a otros campos, como la industria aeroespacial, el área bio y la medioambiental.

J.C. PASTOR: ¿Con qué fondos contáis para la investigación?

M.A. DE MAEZTU: Un gran porcentaje son fondos propios, porque, en definitiva, se trata de em-

presarios que han montado este centro tecnológico. Pero también se recurre a la participación de ayuntamientos, diputaciones, Gobierno Vasco, a fondos del FIS, del Ministerio de Ciencia y Tecnología, a la creación de empresas de alta tecnología, etc. Por ejemplo, crearon una empresa que se llama Lifenova Biomedical, dedicada a biomateriales, y se consiguieron una serie de ayudas en forma de créditos semilla a través de un proyecto Neotec. Aparte, son un centro muy fuerte tecnológicamente. Se trata de 280 investigadores de todo tipo que mantienen colaboraciones con otros centros tecnológicos europeos. Desarrollan grandes proyectos en los que se consiguen financiaciones fuertes para proyectos europeos multicéntricos.

LL. BLANCH: ¿Por qué hay un porcentaje tan elevado de fallos en los implantes? ¿A qué se deben? ¿Hay mecanismos inmunológicos, diferencias entre pacientes, infecciones subyacentes?

M.A. DE MAEZTU: El porcentaje de fracaso de un implante en las zonas ricas en hueso denso es tan sólo de un 1 o 2%, pero aumenta hasta un 30% cuando se trata de zonas posteriores, donde el hueso tiene menor densidad. ¿Cuál es el problema? Simplemente que el porcentaje de hueso que "se agarra" al implante es muy poco. Entonces, sabemos que ese implante tiene muchas posibilidades de que el día de mañana no tenga una estructura de hueso suficiente que soporte las fuertes cargas de la masticación que va a recibir. Lo que hacemos para comprobar la

fuerza de unión es que, en el momento en que van a ser cargados protésicamente, le aplicamos un torque de 35 Nw y vemos si lo soporta o se desprende del hueso. Así valoramos si realmente el implante tiene futuro o no. Luego están los problemas infecciosos, pero se producen en un porcentaje muy pequeño, siempre que se realice un correcto mantenimiento. ¿Qué es lo que se produce en otras ocasiones? Problemas de contaminación de la superficie porque ha estado mal manipulada de fábrica y viene contaminada. Esto hace que se cree tejido fibroso en lugar de tejido óseo alrededor y, a la larga, provoca el fracaso.

Y. ÁLVAREZ: ¿El enlace covalente es el que da dureza, el que hace que el material sea más resistente en movimiento?

M.A. DE MAEZTU: El enlace covalente es un tipo de enlace que en sí es más estable, es decir, que los electrones son más estables cuando el enlace que se establece es de tipo covalente que cuando es de tipo iónico, lo que se traduciría por una mayor estabilidad.

Y. ÁLVAREZ: ¿Y quien hace el enlace covalente?

M.A. DE MAEZTU: Es una unión, en este caso, de tres elementos: titanio, carbono y oxígeno.

Y. ÁLVAREZ: ¿No se tendría que cambiar el nombre de implantación iónica por implantación covalente?

M.A. DE MAEZTU: No, porque realmente la implantación es de iones. El enlace de tipo covalente es el que se establece entre la superficie tratada y el hueso con el que entra en contacto, gracias a dicho tratamiento. Nosotros trabaja-

mos con el implantador iónico, una máquina que se utiliza en otros campos, como el endurecimiento de materiales, por ejemplo, para dar mayor resistencia al desgaste en las prensas, y otras piezas sometidas a fricción. Creo que en Europa existen varias de estas máquinas a nivel de laboratorio (por ejemplo, en Dinamarca y Alemania), además de ésta en San Sebastián. Aparte de estas utilidades industriales se decidió buscarle otras aplicaciones y decidimos investigar su aplicación en el campo biomédico y, en concreto, en el de los implantes dentales.

J. FORTEA: ¿Trabajan solamente en la mejora técnica de los materiales o están en colaboración con otros grupos que investigan, por ejemplo, sobre la generación de masa ósea en la mandíbula o sobre el tratamiento con fibrina? Es una manera de aunar fuerzas y de aumentar el porcentaje de éxitos de los implantes, ¿no?

M.A. DE MAEZTU: En el Centro Tecnológico Inasmet se trabaja con otras líneas de investigación, como son las espumas de titanio o de cerámica, la hidroxiapatita, o las membranas de colágeno que se utilizan para la regeneración ósea. De esta manera, cuando uno se encuentra un defecto óseo puede utilizar, para hacer una regeneración ósea, una matriz de este tipo, unas membranas reabsorbibles, un tratamiento de superficie o la suma de varios tratamientos. Esto se traduce en que si a un paciente le tenemos que hacer una resección de mandíbula porque tiene un carcinoma, por ejemplo, podemos utilizar un poco de todo. Podemos utilizar los bloques de espuma para hacer la reconstrucción, placas de osteosíntesis tratadas y colocar unos implantes que puedan ser más activos en su interacción con el hueso, como es el caso de la implantación iónica.

Monografías Dr. Antonio Esteve publicadas

1. El hospital de día y su repercusión en terapéutica (1985).
2. Problemas que se plantean en el tratamiento de infecciones graves por *S. aureus* (1986).
3. Contribución del biólogo a la farmacología en España (1987).
4. Un glosario para farmacólogos (1987).
5. Aspectos biológicos de los síndromes depresivos (1988).
6. Bases del tratamiento de las intoxicaciones agudas (1988).
7. Investigación básica y medicina clínica (1988).
8. Tratamiento de datos en farmacología (1989).
9. Perspectivas terapéuticas en la esclerosis múltiple (1989).
10. Biotecnología de aplicación farmacéutica (1991).
11. Metodología del ensayo clínico (1991).
12. Periodismo científico. Un simposio internacional (1991).
13. El ensayo clínico como tarea cooperativa (1992).
14. Terapéutica y calidad de vida (1993).
15. Investigación sobre cáncer en España: de la biología molecular a la clínica (1994).
16. El tratamiento del dolor: del laboratorio a la clínica (1994).
17. Farmacología de los canales iónicos (1995).
18. Bases de datos en farmacología y terapéutica (1996).
19. Fármacos y conducción de vehículos (1996).
20. Traducción y lenguaje en medicina (1997).
21. Medicina y medios de comunicación. Traducción al español de una serie publicada en la revista *The Lancet* (1997).
22. Problemas y controversias en torno al ensayo clínico (1998).
23. Glosario de investigación clínica y epidemiológica (1998).
24. Transducción de señales como diana farmacológica (1999).
25. Investigación médico-farmacéutica en atención primaria. Una visión a través de las publicaciones de la REAP (1999).
26. Modelos experimentales de patología infecciosa (2000).
27. Diccionario de farmacología y temas afines (2000).
28. Educación sanitaria: información al paciente sobre los medicamentos (2000).
29. Aspectos conceptuales del ensayo clínico. Una revisión a través de artículos publicados en *Medicina Clínica* (1990-1999) (2000).
30. Ensayos clínicos en intervenciones no farmacológicas (2001).
31. Aspectos básicos y clínicos sobre la neurobiología de la adicción (2003).