

7

MONOGRAFIAS DR. ANTONIO ESTEVE

INVESTIGACION
BASICA
Y MEDICINA
CLINICA

S. Erill • J.V. Castell

7

MONOGRAFIAS DR. ANTONIO ESTEVE

INVESTIGACION
BASICA
Y MEDICINA
CLINICA

S. Erill • J.V. Castell

© 1988, Fundación Dr. Antonio Esteve
ISBN 84-404-2519-8
Depósito legal: B-20.508-88
Coordinación y producción:
Ediciones Doyma, S.A.
Travesera de Gracia, 17-21/08021 Barcelona
Impreso en España por Alogran
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 son recogidas 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, así como las conferencias periódicas «Dr. Antonio Esteve» y otras formas de apoyo a las ciencias médicas, farmacéuticas y biológicas.

Investigación básica y medicina clínica

S. ERILL y J.V. CASTELL	
Introducción	9
<hr/>	
L. AGUILERA y R. CALVO	
Unión a las proteínas plasmáticas y acceso de las benzodiazepinas al sistema nervioso central	11
<hr/>	
E. ALBORCH, G. TORREGROSA, J.B. SALOM, F.J. MIRANDA y V. CAMPOS	
Investigación sobre circulación cerebral: aportación experimental al conocimiento de la fisiopatología y terapéutica del espasmo vascular cerebral	17
<hr/>	
B. CASANUEVA	
Estudio de las células secretoras de inmunoglobulinas y su regulación en la púrpura de Schönlein-Henoch y nefropatía IgA	25
<hr/>	
M. CASAS	
Desarrollo de un modelo animal para el síndrome de Lesch-Nyhan	35
<hr/>	
J. COSÍN, A. HERNÁNDEZ, T. CAFFARENA, F. ANDRÉS y B. GRAULLERA	
Automatismo cardíaco normal y anormal	45

J.E. FELIU	
Sulfonilureas y metabolismo hepático de la glucosa	57
<hr/>	
F. GIRVENT	
Estudio clínico experimental de la reparación ósea	65
<hr/>	
A. ORDINAS, E. BASTIDA, G. ESCOLAR y R. CASTILLO	
Estudio de la adhesión plaquetaria mediante técnicas de perfusión. Su interés clínico y experimental	69
<hr/>	
M. PÉREZ-MATEO y N. VÁZQUEZ	
Pancreatitis aguda experimental	75
<hr/>	
J.M. REVUELTA y L. GAITE	
Substitución protésica de las cuerdas tendinosas de la válvula mitral	83
<hr/>	
G. VÁZQUEZ MATA J.M. TORRES RUIZ y P. NAVARRETE	
Perspectivas de la neumología en el paciente crítico	89

Relación de participantes

L. AGUILERA

Sección de Anestesiología
y Reanimación.
Hospital de Galdakao
Barrio Labreaga, s/n
48960 Galdakao
Vizcaya

F. ALAMILLOS

Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial
Hospital de la Princesa
Diego de León, 62
28006 Madrid

E. ALBORCH

Centro de Investigación
Hospital La Fe
Avda. Campanar, 21
46009 Valencia

D. ANDREU

Servicio de Oftalmología
Hospital Príncipes de España
Feixa Llarga, s/n
08907 Hospitalet de Llobregat
Barcelona

M. BALSELLS

Servicio de Endocrinología y Nutrición
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Avda. Sant Antoni M.^o Claret, 167
08025 Barcelona

J. BIGORRA

Servicio de Farmacología Clínica
Hospital Clínic i Provincial
Villarroel, 170
08036 Barcelona

J.L. CARRASCO

Departamento de Psiquiatría
Centro Ramón y Cajal
Ctra. Colmenar, Km. 9,1
28034 Madrid

B. CASANUEVA

Laboratorio de Inmunología
Hospital Nacional Marqués
de Valdecilla
Avda. Valdecilla, s/n
39008 Santander

M. CASAS

Sección de Psicofarmacología
Servicio de Psiquiatría
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Avda. Sant Antoni M.^a Claret, 167
08025 Barcelona

J.V. CASTELL

Centro de Investigación
Hospital La Fe
Avda. Campanar, 21
46009 Valencia

J. COSÍN

Centro de Investigación
Hospital La Fe
Avda. Campanar, 21
46009 Valencia

S. ERILL

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

J. E. FELIU

Servicio de Endocrinología
Experimental
Clínica Puerta de Hierro
San Martín de Porres, 4
28035 Madrid

F. GIRVENT

Hospital de Sabadell
Clínica Santa Fe
Parque Taulí, s/n
08208 Sabadell
Barcelona

F.J. GONZÁLEZ

Departamento de Pediatría
Ciudad Sanitaria La Paz
P.^o de la Castellana, 261
28046 Madrid

A. HERNÁNDEZ

Servicio de Neumología
Centro Ramón y Cajal
Ctra. Colmenar, Km. 9,1
28034 Madrid

N. LANDA

Hospital de Cruces
Barrio de Cruces
BARACALDO
Vizcaya

J.M. LÓPEZ VEGA

Servicio de Oncología Médica
Hospital Clínico de San Carlos
Ciudad Universitaria
28040 Madrid

C. MARTÍNEZ

Servicio de Alergología
Centro Ramón y Cajal
Ctra. Colmenar, Km. 9,1
28034 Madrid

A. ORDINAS

Servicio de Hemoterapia
y Hemostasia
Hospital Clínico i Provincial
Villarreal, 170
08036 Barcelona

M. PÉREZ MATEO

Hospital del INSALUD
Servicio de Gastroenterología
Huertos y Molinos, s/n
03200 Elche
Alicante

E. POCH

Servicio de Nefrología
Hospital Clínico i Provincial
Villarreal, 170
08036 Barcelona

J.M. REVUELTA

Hospital Nacional Marqués
de Valdecilla
Avda. Valdecilla, s/n
39008 Santander

E. SANZ

Servicio de Cardiología
Hospital Vall d'Hebron
P.^o Vall d'Hebron, s/n
08035 Barcelona

J. SEGOVIA

Servicio de Cardiología
Clínica Puerta de Hierro
San Martín de Porres, 4
28035 Madrid

C. SERRANO

Servicio de Enfermedades del
Aparato Digestivo
Clínica Puerta de Hierro
San Martín de Porres, 4
28035 Madrid

G. VÁZQUEZ

Servicio de Medicina Intensiva
Ciudad Sanitaria Virgen de las
Nieves
Avda. Calvo Sotelo
18017 Granada

Introducción

Hace ya más de tres cuartos de siglo, la Carnegie Foundation publicó un estudio sobre educación médica en los Estados Unidos, realizado por Abraham Flexner. *The Flexner Report* dio origen a una profunda renovación de la enseñanza de la medicina y de la estructura de los hospitales en aquel país, y sus resultados son hoy día bien patentes en todo el mundo. En un momento en el que dominaba el concepto de una oposición fundamental entre medicina práctica y ciencia médica, Flexner no dudó en escribir que «investigación y práctica son, pues, una en espíritu, método y objeto» y en recomendar una ferviente dedicación a la investigación básica como sólido fundamento para la enseñanza de la medicina clínica.

Es posible que esta evocación de Flexner pueda parecer gratuita. Es evidente que a lo largo de estos 75 años la investigación médica básica también ha avanzado en España, pero no se hace difícil descubrir que queda amplio espacio para el progreso. La mesa redonda que recoge esta monografía nació precisamente del deseo de demostrar a quienes se inician en el ejercicio de la medicina que investigación básica y práctica clínica no son necesariamente incompatibles. Para ello, reunimos a una serie de investigadores que han sido capaces de compaginar ambas tareas y les pedimos que expusieran una muestra de la labor de investigación que actualmente les ocupa. Es evidente que la selección de los ponentes fue del todo subjeti-

va y que, junto a razones de conocimiento o de familiaridad con el estudio experimental, intervinieron tanto factores geográficos como de diversidad de las áreas de investigación. En consecuencia, sería incorrecto ver en cualquier ausencia un juicio de valor. Por otra parte, la multiplicidad de áreas consideradas planteaba algunos problemas para la discusión de las diversas ponencias, pero como podrá fácilmente apreciar el lector, la decisión de invitar a destacados nuevos miembros del programa MIR representó la posibilidad de presentar la realidad de una simbiosis investigación básica - medicina clínica a los sectores que más pueden cultivarla, y un elemento aglutinador de una discusión fructífera.

A la vez que reiteramos nuestro agradecimiento a todos cuantos participaron en la reunión, deseamos expresar con ellos el deseo de que, para muchos nuevos licenciados, la posibilidad de compartir el ejercicio de la medicina con una tarea de investigación básica sea, cuando menos, una fuerte tentación.

S. Erill* y J.V. Castell**

*Fundación Dr. Antonio Esteve.
Barcelona.

**Centro de Investigación
Hospital la Fe.
Valencia.

Unión a las proteínas plasmáticas y acceso de las benzodiacepinas al sistema nervioso central

L. Aguilera* y R. Calvo**

*Sección de Anestesiología-Reanimación. Hospital Galdakao. Galdakao. Vizcaya. **Departamento de Farmacología. Universidad del País Vasco. Leioa. Vizcaya.

La acción farmacológica está determinada por la interacción fisicoquímica entre el fármaco y ciertas moléculas (generalmente denominadas receptores) presentes en el organismo. Pero para que esta interacción tenga lugar, el fármaco debe llegar al punto de acción, ya que la magnitud de la respuesta estará en relación con la concentración de fármaco en dicho lugar (biofase). Dado que tiene que cruzar numerosas membranas biológicas para llegar a la biofase, existen muchos factores que determinan su concentración en la misma, como son sus características fisicoquímicas y farmacocinéticas, su forma de administración y las variables fisiopatológicas o genéticas de cada individuo.

Todos estos factores, en especial los farmacocinéticos, son de relevancia clínica en el caso de las benzodiacepinas, ya que hoy día se admite que las acciones clínicas de estas sustancias tan amplias y variables (ansiolítica, hipnótica, etc.,) están en función precisamente de sus propiedades farmacocinéticas. Tomando como base las diferencias farmacocinéticas entre las distintas sustancias de esta amplia familia, es posible su valoración y aplicación clínica diferenciada¹.

Se acepta universalmente que las benzodiacepinas realizan sus funciones sólo a través de su unión con receptores específicos benzodiacepínicos, que se encuentran exclusivamente en el sistema nervioso central (SNC)². El acceso de fármacos al SNC constituye uno de los puntos más conflictivos y discutidos dentro del amplio campo de la distribución de fármacos en el organismo. Hace años que se ha superado el concepto de barrera hematoencefálica, y hoy se admite que la a veces restringida distribución de fármacos en el SNC se debe a las diferencias estructurales y funcionales de las células endoteliales del capilar respecto a las de otros territorios del organismo. En cambio, los proce-

dos que regulan el paso de sustancias al SNC son semejantes a los que intervienen en otros puntos, destacando su liposolubilidad, grado de ionización, fijación a proteínas plasmáticas, aporte sanguíneo y la existencia de sistemas de transporte activo.

La influencia de factores como liposolubilidad y grado de disociación en el acceso de fármacos al SNC es ampliamente conocido y generalmente se supone que todas las benzodiacepinas son suficientemente liposolubles como para que su distribución de la sangre al cerebro no se encuentre limitada. Sin embargo, sus diferencias en este sentido sí son importantes en la práctica clínica, ya que pueden determinar su inicio y duración de acción. Así, el flunitracepam y el diacepam penetran rápidamente en el SNC, debido a su mayor liposolubilidad, y por tanto el comienzo de su acción es rápido. Sin embargo, el loracepam presenta un comienzo de acción más lento (10 min tras administración intravenosa) que se explicaría por su menor coeficiente de reparto lípido/agua³. El midazolam, una nueva benzodiacepina soluble en agua, presenta curiosamente un inicio de acción muy rápido (30 seg); esto es debido a que en la sangre, a pH 7,4, cambia su estructura, convirtiéndose en una molécula altamente liposoluble⁴. La utilidad de algunos de estos fármacos como hipnóticos viene justificada por la rápida aparición de sus efectos.

También la duración de la acción de las benzodiacepinas está en relación con su distribución, que a su vez depende de su liposolubilidad. Otros factores (como la metabolización) parecen desempeñar un papel secundario en la finalización de la acción de estos fármacos, sobre todo cuando se administran a dosis única intravenosa. Así, el diacepam tiene una duración de acción relativamente corta, a pesar de su tiempo de vida media largo (40 h), debido

TABLA I
 FIJACIÓN DE DIACEPAM, FLUNITRACEPAM Y LORACEPAM A LAS PROTEÍNAS
 PLASMÁTICAS TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE HEPARINA *IN VIVO*

	Fracción libre (%)		
	Diacepam (1 µg/ml)	Loracepam (50 ng/ml)	Flunitracepam (0,5 µg/ml)
Antes (n=5)	1,88 ± 0,10	9,43 ± 0,43	3,70 ± 0,22
Tras heparina (10 min) (n=5)	3,20 ± 0,55*	9,67 ± 1,24	6,20 ± 1,24*

*p < 0,05. Incremento de ácidos grasos libres: de 0,16 mEq/l (control) a 0,34 ± 0,08 mEq/l (tras heparina, 10 min), p < 0,01.

a su distribución rápida y amplia a tejidos periféricos¹.

Pero hay otro factor, menos estudiado y sin embargo muy importante en la práctica, que puede ser influido por alteraciones fisiopatológicas y terapéuticas: la fijación a las proteínas plasmáticas. Se sabe que la fijación de fármacos a las proteínas plasmáticas constituye un factor limitante en su acceso al SNC⁵ y se admite también que únicamente la fracción libre es farmacológicamente activa. Por tanto, incluso pequeños cambios en la fijación de fármacos que se unen en gran proporción a las proteínas plasmáticas y que actúan en el SNC, como es el caso de las benzodiazepinas, pueden alterar su respuesta clínica y su toxicidad.

Todas las benzodiazepinas se unen en alta proporción a las proteínas plasmáticas (84-99 %) con la única excepción del clonazepam (47 %). La albúmina es la principal proteína implicada en la fijación de estos fármacos, habiéndose descrito incluso un lugar de fijación específico para el diacepam denominado lugar II, al que se unen además algunas otras sustancias con estructura de ácidos carboxílicos⁶. Se sabe también que los ácidos grasos endógenos, a pesar de poseer sus propios lugares de fijación, cuando alcanzan niveles supra fisiológicos, se unen al lugar II, influyendo en la fijación del diacepam al mismo⁷. Otros lugares de fijación de fármacos en la albúmina son el lugar I, al que se fijan inespecíficamente muchos fármacos y sustancias endógenas, y el lugar III, específico de digoxina y otros glucósidos cardiotónicos.

El conocimiento del lugar y de las características de fijación de una sustancia a las proteínas plasmáticas es fundamental a la hora de poder predecir cómo se verán afectados sus efectos farmacológicos, debido a administración simultánea de otros productos, o a situaciones fisiopatológicas presentes en el individuo.

La mayoría de los estudios que existen en la literatura en este sentido sobre las benzodiazepinas se limitan al diacepam, asumiendo un comportamiento similar del resto de las sustancias de este grupo. Así, se han descrito cambios en la fracción libre de diacepam en presencia de niveles elevados de ácidos grasos libres, debido a la administración de heparina⁸. El flunitracepam presenta un comportamiento similar al descrito para el diacepam, mientras que el loracepam no se ve afectado por incrementos en los niveles de ácidos grasos libres^{9,10} (tabla I). No existen datos en este sentido para otras benzodiazepinas, pero estos hallazgos apuntan a considerar un poco simplista la idea de tomar el diacepam como modelo y presuponer modificaciones semejantes en la fijación plasmática de todas las benzodiazepinas.

De hecho, el valproato sódico, fármaco antiépico cuya estructura química es muy semejante a los ácidos grasos, desplaza al diacepam de su fijación a la albúmina, tanto cuando se añade a suero de voluntarios como cuando se estudia en pacientes sometidos a terapia con valproato sódico¹¹.

El flunitracepam y el diacepam presentan un comportamiento similar, pero no así el loracepam cuya fijación a proteínas plasmáticas no se ve afectada por concentraciones terapéuticas de valproato sódico¹² (tabla II). Esta menor tendencia del loracepam a cambiar su fracción libre en presencia de valproato podría hacer su uso más recomendable, en lugar del diacepam, en el tratamiento del estatus epiléptico¹³ en pacientes que reciben valproato sódico.

Otro tema atrayente desde el punto de vista clínico es el papel que pueden desempeñar diversos estados fisiopatológicos en la fijación plasmática de las benzodiazepinas. La insuficiencia renal fue el primer estado patológico donde se observó un incremento de la fracción libre de

TABLA II
EFECTO DEL VALPROATO SÓDICO SOBRE LA FIJACIÓN PROTEICA DE DIACEPAM,
LORACEPAM Y FLUNITRACEPAM

	Control	Valproato (100 µg/ml)	Valproato (1.000 µg/ml)
Porcentaje libre de diacepam (1 µg/ml) (n=10)	2,01 ± 0,12	4,30 ± 0,21*	10,94 ± 1,10*
Porcentaje libre de loracepam (50 ng/ml) (n=10)	11,02 ± 0,34	13,77 ± 0,70**	23,02 ± 0,43*
Porcentaje libre de flunitracepam (0,5 µg/ml) (n=10)	4,30 ± 0,26	5,01 ± 0,43**	20,18 ± 1,20*

*p < 0,05. **Diferencia no significativa.

TABLA III
FIJACIÓN DEL DIACEPAM Y LORACEPAM EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL

	Diacepam libre (%)	Loracepam libre (%)	Albúmina (g/l)	Ácidos grasos (mEq/l)
Control (n=12)	1,82 ± 0,18	10,38 ± 0,63	45,80 ± 1,5	0,16 ± 0,06
Pacientes con insuficiencia renal (n=12)	4,24 ± 0,41*	18,29 ± 1,56*	37,95 ± 1,3***	0,22 ± 0,08**

*p < 0,001. **Coeficiente de correlación: porcentaje libre de diacepam versus ácidos grasos libres: 0,6940; p < 0,01. ***Coeficiente de correlación: porcentaje libre de diacepam versus albúmina: -0,6994; p < 0,02.

numerosos fármacos¹⁴. La fijación de diacepam a las proteínas plasmáticas está también disminuida en pacientes con insuficiencia renal¹⁵; esta disminución se relaciona en parte con el descenso en las cifras de albúmina, y también con la presencia de sustancias endógenas (como por ejemplo ácidos grasos libres), que interfieren en su fijación. La unión del loracepam también está afectada en estos enfermos; sin embargo, el incremento en la fracción libre no está relacionada con los niveles de ácidos grasos, como era de esperar (tabla III)¹⁶. Se han descrito también aumentos en fracción libre del midazolam¹⁷ y oxacepam¹⁸ en pacientes renales en relación a voluntarios sanos. En los enfermos con cirrosis hepática se han detectado cambios en la fijación de diacepam¹⁹ y loracepam¹⁶. La disminución en la fijación observada en estos pacientes correlaciona negativamente con la hipoalbuminemia, por lo que éste parece ser el único factor responsable de los cambios observados (tabla IV)¹⁶. No existen datos sobre la influencia de estas patologías en la fijación plasmática de otras benzodiazepinas.

Todo lo expuesto se refiere a datos *in vitro*, situación alejada de la real, y, por tanto, la repercusión clínica de los cambios antes comenta-

dos puede presuponerse, pero es difícil de evaluar. Existen escasos datos sobre la trascendencia en la práctica diaria de las modificaciones anteriormente descritas. Greenblatt y Koch-Weser, en 1974²⁰, observaron una depresión excesiva del SNC en pacientes tratados con diacepam y clordiacepóxido, que asociaron a sus bajos niveles de albúmina sérica. Se ha descrito también un aumento de la incidencia de toxicidad debida a fluracepam y nitracepam en ancianos, que se ha asociado a cambios en su fijación a las proteínas plasmáticas²¹.

Más recientemente, Halliday et al²² han observado en 101 pacientes una relación entre el tiempo de inducción de anestesia con midazolam y las cifras de albúmina. Estos autores han detectado, así mismo, un mayor efecto del midazolam en pacientes previamente tratados con ácido acetilsalicílico, hecho que han atribuido al desplazamiento del midazolam de su fijación a la albúmina por este analgésico.

Sin embargo, es difícil obtener *in vivo* evidencia de que cambios en la fracción libre de estos fármacos sean los responsables de su mayor acceso al SNC, y por tanto, de la potenciación de sus efectos, por lo que es preciso con frecuencia recurrir a modelos animales.

TABLA IV
FIJACIÓN DE DIACEPAM Y LORACEPAM EN PACIENTES CIRRÓTICOS

	Diacepam libre (%)	Loracepam libre (%)	Albúmina (g/l)
Control (n=7)	1,82 ± 0,18	10,38 ± 0,63	45,70 ± 1,3
Cirróticos (n=7)	4,55 ± 0,57*	18,70 ± 1,75*	29,00 ± 1,8**

* $p < 0,001$. **Coeficiente de correlación: porcentaje libre de diacepam *versus* albúmina: $-0,9091$; $p < 0,001$; porcentaje libre de loracepam *versus* albúmina: $-0,9285$; $p < 0,001$.

Uno de los primeros estudios realizados en este sentido se refiere al tiopental. Gsögor y Kezrez, en 1970²³, demostraron que ratas pretratadas con una sulfamida (desplazante del tiopental de su fijación a la albúmina *in vitro*) necesitaban menos dosis del barbitúrico para alcanzar el mismo grado de anestesia, valorado por la pérdida del reflejo corneal. Así mismo, en un trabajo realizado en conejos, se demostró que los animales pretratados con valproato sódico, tras anestesia con tiopental perdían el reflejo corneal con dosis del orden de la mitad de las necesarias en animales control²⁴.

Respecto a las benzodiazepinas, existían pocos datos en la literatura. Por tanto, se ha valorado la repercusión en su acceso al SNC en situaciones como las comentadas anteriormente, donde se habían observado previamente cambios *in vitro*.

Se determinó en un grupo de conejos la dosis de flunitracepam necesaria para inducir el sueño, y se observó que era significativamente menor cuando los animales eran pretratados con una sola dosis intravenosa de valproato sódico²⁵. Los niveles libres en suero y los cerebrales en dichos animales estaban aumentados respecto a los controles, lo que indica que el mayor efecto del flunitracepam es debido a su mayor acceso al SNC, como consecuencia del incremento en la fracción libre, y no a una interacción farmacodinámica. Hechos similares se observaron con midazolam²⁶, con la peculiaridad de que el tratamiento con valproato dio lugar, en este caso, a la aparición de depresión respiratoria en el 50 % de los animales estudiados, asociada a niveles elevados de midazolam en cerebro.

Por otra parte, cuando se realizó un estudio con midazolam en animales a los que previamente se indujo una insuficiencia renal, se obtuvieron resultados similares²⁷, que una vez

más han puesto de manifiesto la existencia de una relación entre el incremento en la fracción libre plasmática de las benzodiazepinas y su mayor acceso al SNC.

Ante estos resultados, se recomienda al clínico una mayor precaución en la utilización de estos fármacos en la anestesia cuando se sospechen cambios en su fijación a las proteínas plasmáticas, que pueden ser inducidos por situaciones fisiopatológicas preexistentes o interacciones con otros fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

1. KANTO J, KLÖTZ W. Intravenous benzodiazepines as anaesthetic agents: pharmacokinetics and clinical consequences. *Acta Anaesth Scand* 1982; 26: 554-569.
2. COSTA E. The role of gamma-aminobutyric acid in the action of 1'-4 benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci* 1979; 1: 1-44.
3. AMEER B, GREENBLATT D. Lorazepam: a review of its clinical pharmacological properties and therapeutic uses. *Drugs* 1981; 21: 161-170.
4. DUNDEE J, HALLYDAY N, LONGHRAN P. Variation in response to midazolam. *Br J Clin Pharmacol* 1984; 17: 645P-646P.
5. ERILL S. Paso de fármacos al sistema nervioso central. En: J. Esplugues. *Perspectivas terapéuticas: sistema nervioso central*. Valencia, Fundación García Muñoz, 1981; 1-6.
6. SUDLOW G, BIRKETT D, WADE D. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* 1976; 12: 1.502-1.561.
7. SELLERS EM, NARANJO C, ABEL J, KHONW V, ALEXANDER P. Fatty acid modulation or reciprocal variation in diazepam and warfarin free fraction. *Clin Pharmacol Ther* 1980; 27: 285.
8. NARANJO C, KNEW V, SELLERS EM. Nonfatty acid-modulated variations in drug binding due to heparin. *Clin Pharmacol Ther* 1982; 31: 746-752.

9. CALVO R, CARLOS R, AGUILERA L, TRINCADO G. Estudio comparativo de la fijación de diazepam y lorazepam a las proteínas plasmáticas. II Reunión Luso-Española de Farmacología. Coimbra, 1983; F 18.
10. RODRIGUEZ-SASIAIN JM, CALVO R, CARLOS R. Influencia de diversos factores sobre la unión del flunitrazepam a las proteínas plasmáticas. XXVI Congreso Nacional de la AEFH. La Toja, 1981; 245-249.
11. DHILLON S, RICHENS A. Serum protein binding of diazepam and its displacement by valproic acid in vitro. *Br J Clin* 1982; 12: 591-592.
12. CALVO R, CARLOS R, ERILL S. Differential effects of valproic acid on the serum protein binding of lorazepam and diazepam. *Int J Clin Pharmacol Res* 1986; 6: 213-215.
13. WALKER J, HOMAN R, VASKO M. Lorazepam in status epilepticus. *Ann Neurol* 1979; 6: 207-210.
14. REIDENBERG MM, AFFRIME M. Influence of disease on binding of drugs to plasma protein. *Ann NY Acad Sci* 1973; 226: 115-126.
15. KOBER A, SJÖHÖLM I, BORG A, ÖDAR-CEDERLÖF I. Protein binding of diazepam and digitoxin in uremic and normal serum. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 311-316.
16. AGUILERA L. Estudio de la fijación a las proteínas plasmáticas de diazepam, lorazepam y flunitrazepam en distintas situaciones fisiopatológicas y terapéuticas. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco. Leioa, 1986.
17. VINIK HR, REVES JG, GREENBLATT DJ, ABERRETHY DR, SMITH LR. The pharmacokinetics of midazolam in chronic renal failure patients. *Anesthesiology* 1983; 59: 390-394.
18. ÖDAR-CEDERLÖF I, LUNDE D, SJÖQVIST F. Oxazepam disposition in uremic patients. *Acta Pharmacol Toxicol* 1977; 40: 52-62.
19. KLOTZ U, AVANT G, HOYUMPA A, SCHENKER S, WILKINSON G. The effects of age and liver disease on the disposition and elimination of diazepam in adult man. *J Clin Invest* 1975; 55: 347-359.
20. GREENBLATT D, KOCH-WESSER J. Clinical toxicity of chlordiazepoxide and diazepam in relation to serum albumin concentration. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program. *Br J Clin Pharmacol* 1974; 7: 259-262.
21. GREENBLATT D, SHODER R. Caution on use of benzodiazepines in the elderly. *N Eng J Med* 1979; 300: 1.054-1.055.
22. HALLIDAY MJ, DUNDEE J, COLLIER PS, LOUGHON PG, HARPER KW. Influence of plasma proteins on the onset of hypnotic action of intravenous midazolam. *Anaesthesia* 1985; 40: 763-766.
23. CSÖGÖR SI, KEREZ SF. Enhancement of thiopentone anaesthesia by sulphafurazole. *Br J Anaesth* 1970; 42: 988-991.
24. AGUILERA L, CALVO R, CARLOS R. Interaction between thiopentone and sodium valproate: an in vitro and in vivo study. *Br J Anaesth* 1986; 58: 1.380-1.383.
25. SUÁREZ E, SMITH Y, AGUILERA L, CALVO R. Cambios en la respuesta farmacológica del flunitrazepam motivados por la administración concomitante de valproato sódico. VIII Reunión Nacional de la Asociación Española de Farmacólogos. Jaca, 1984; 86.
26. SUÁREZ E, RATÓN J, CALVO R. Cambios en la fijación proteica y en la respuesta de midazolam inducidos por la administración previa de valproato sódico. *Rev Farmacol Clín Exper (Valencia)* 1985; 207.
27. SUÁREZ E, MARTINEZ I, VESGA MA, CALVO R. Influencia de la insuficiencia renal en la cinética de midazolam. Estudio «in vitro» e «in vivo». XI Reunión Nacional de la Sociedad Española de Farmacología. Santander, 1986; 183.

DISCUSIÓN

- S. ERILL: Quisiera preguntar si, aparte de estos hallazgos relativos a la cifra de albúmina y la duración del efecto de estos compuestos, se han observado en la clínica casos de sedación excesiva o de depresión respiratoria e inesperada con fármacos sensibles a la tasa de fijación a las proteínas, como por ejemplo diazepam.
- L. AGUILERA: Efectivamente, es un hecho conocido en clínica que algunos pacientes presentan sedación excesiva con dosis relativamente bajas de diazepam. Esto sería especialmente cierto en pacientes con insuficiencia renal, cirrosis hepática, grandes quemados o neoplásicos en situación terminal, lo cual debe tenerse en cuenta para ajustar debidamente la dosis.

- M. PÉREZ-MATEOS: Quisiera plantear dos preguntas: ¿qué sistema de determinación se ha utilizado para medir la fracción libre de benzodiazepinas? y en relación con la pregunta del Dr. Erill, ¿han estudiado o tienen previsto llevar a cabo un estudio similar en pacientes con insuficiencia respiratoria? Hace algún tiempo comunicamos una alteración de la fijación de otros fármacos en esta situación, y quizá los cambios de PO₂, PCO₂ y pH podrían contribuir a explicar la especial sensibilidad que estos pacientes tienen a las benzodiazepinas.
- L. AGUILERA: Respecto a la primera pregunta utilizamos la ultrafiltración. La segunda pregunta representa una buena sugerencia, puesto que es una observación clínica ampliamente aceptada que los pacientes con hiperventilación y

PCO₂ bajas presentan una mayor respuesta a las benzodicepinas.

S. ERILL: Me ha llamado la atención el hecho de que se haya citado precisamente el loracepam como un fármaco en el que se dan modificaciones de la fijación a proteínas, siendo un medicamento que se utiliza, o pretende utilizarse, para inducir amnesia en situaciones como cardioversión o en procedimientos dolorosos como la punción esternal, que a veces pueden requerir cierta disminución del nivel de consciencia. A mi entender es importante que se confirme el que un fármaco de este tipo no está sujeto a los avatares que puedan representar cambios de la tasa de albúmina por hipoalbuminemia o por

insuficiencia renal. Me pregunto si alguno de los presentes puede aportar más información en este sentido.

G. VÁZQUEZ: Yo trabajo en una unidad de cuidados intensivos, y la comunicación del Dr. Aguilera es muy interesante para los intensivistas por muchos motivos. En primer lugar, por la afectación multiorgánica que actualmente caracteriza a nuestros pacientes, los desequilibrios del medio interno que presentan sistemáticamente y por la administración simultánea de múltiples terapéuticas. Creo que el estudio del comportamiento de los fármacos en estas circunstancias es una línea de investigación interesante y necesaria en nuestro ámbito.

Investigación sobre circulación cerebral: aportación experimental al conocimiento de la fisiopatología y terapéutica del espasmo vascular cerebral

E. Alborch, G. Torregrosa, J.B. Salom, F.J. Miranda y V. Campos

Centro de Investigación. Hospital La Fe. Departamento de Fisiología. Universitat de València. Valencia.

Consideraciones previas

En fisiología existe una estrecha relación entre la actividad funcional, el metabolismo energético y el flujo sanguíneo en el cerebro. Las estructuras cerebrales están más o menos profundadas en proporción a sus demandas metabólicas, las cuales a su vez están relacionadas con la actividad funcional. Esta adecuación entre flujo, metabolismo y función puede verse alterada en determinadas condiciones patológicas que perturban la homeostasis energética celular, bien como consecuencia de la disminución en la oferta (isquemia, hipoxia e hipoglucemia), bien como resultado de un incremento en la demanda metabólica debido a una actividad neuronal patológicamente aumentada (lesiones epilépticas)¹.

Las enfermedades cerebrovasculares, bajo cuya denominación se incluyen formas muy diversas de patología, son, tanto por su frecuencia como por su índice de mortalidad, de gran importancia en la práctica médica². Los enfermos cerebrovasculares representan un 50 % de los ingresos de adultos en los hospitales neurológicos³, y se ha calculado que cada año dos de cada 1.000 habitantes presentan un accidente vascular cerebral⁴. Por otra parte, los estudios epidemiológicos muestran también que en España las enfermedades cerebrovasculares suponen la segunda causa de mortalidad (16,98 % de la mortalidad total), precedida por los tumores malignos (19,60 %) y seguida por las enfermedades isquémicas cardíacas⁵. Además, las enfermedades cerebrovasculares constituyen la causa más frecuente de invalidez permanente en el mundo occidental⁶. La importancia médica y social de estas enfermeda-

des es, pues, demasiado conocida y, en consecuencia, no puede ni debe ser subestimada.

Desde el inicio de nuestra actividad investigadora en la Unidad de Circulación Cerebral del Centro de Investigación del Hospital La Fe de Valencia, hemos centrado fundamentalmente la atención en el estudio de la fisiopatología de la circulación cerebral y en la investigación de los fundamentos farmacológicos de determinadas sustancias que pueden ser susceptibles de utilizarse como medidas terapéuticas. Nuestros objetivos consisten en: a) el conocimiento de los mecanismos fisiológicos de regulación de la circulación cerebral; b) el análisis de la reactividad de los vasos cerebrales en condiciones patológicas y de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la patogenia de determinados procesos vasculares cerebrales, y c) el estudio de los efectos y mecanismo de acción de fármacos vasoactivos sobre la circulación cerebral.

En nuestras investigaciones se utilizan dos aproximaciones experimentales: un modelo experimental *in vivo*, desarrollado en la cabra, que permite la medición del flujo sanguíneo cerebral y otros parámetros hemodinámicos y metabólicos en el animal sin anestesiarse, y un modelo experimental *in vitro* que consiste en el registro de la tensión isométrica desarrollada por segmentos de arterias cerebrales mantenidos en un baño de órganos.

Las líneas de investigación actualmente en curso en nuestro laboratorio son las siguientes:

1. Espasmo vascular cerebral y fármacos calcioantagonistas: a) reactividad de los vasos cerebrales frente a noradrenalina, 5-hidroxitriptamina, prostaglandina F_{2α}, KCl y líquido cefalorraquídeo procedente de pacientes con hemorragia subaracnoidea y de cabras a las que se

ha inducido experimentalmente dicha hemorragia, y *b*) estudio del efecto de los fármacos antagonistas del calcio *per se* y sobre la vasoconstricción cerebral inducida por los estímulos espasmogénicos mencionados.

2. Evaluación de la hipótesis purinérgica en la circulación cerebral: identificación de los receptores que median la respuesta vascular cerebral a la adenosina y sus derivados, y su posible participación en la regulación del flujo sanguíneo cerebral.

3. Neuromodulación en los vasos cerebrales: regulación de la liberación de noradrenalina desde las terminaciones nerviosas simpáticas perivasculares, debido a la acción de sustancias liberadas por los tejidos efectores o existentes normalmente en la circulación sanguínea.

El planteamiento de las líneas de investigación desarrolladas por nuestro grupo está condicionado por el hecho de realizar nuestra labor investigadora en un centro incluido en el conjunto de un hospital. La proximidad entre ambos posibilita el establecimiento de relaciones entre la investigación clínica y básica. El contacto del investigador básico con los problemas clínicos va a condicionar el que sus planteamientos científicos no sean exclusivamente básicos sino aplicados, orientados hacia la fisiopatología o hacia la terapéutica. Como exponente de la orientación de la investigación básica hacia los problemas de la medicina clínica, vamos a presentar brevemente el planteamiento realizado y los resultados obtenidos hasta el momento de uno de los proyectos de investigación que estamos actualmente realizando:

Introducción

El espasmo vascular cerebral secundario a una hemorragia subaracnoide (HSA) está considerado como la principal causa de los trastornos neurológicos que se presentan asociados a esta patología, y responsable del incremento de su morbilidad y mortalidad⁷. En la actualidad, a juicio de neurólogos y neurocirujanos no se dispone de unos procedimientos terapéuticos suficientemente satisfactorios para suprimir el espasmo y, en consecuencia, prevenir el infarto cerebral. Gran parte de estas dificultades terapéuticas derivan de una falta de conocimiento preciso acerca de los factores etiopatogénicos responsables del vasospasmo⁸.

El espasmo vascular cerebral se origina por la interacción de numerosas sustancias (5-hidroxitriptamina, catecolaminas, prostaglandi-

nas, hemoglobina e hidróxidos lipídicos), que son liberadas tanto por el hematoma subaracnoide como por los vasos cerebrales⁹. Aunque los posibles estímulos o factores son diversos, el proceso básico común para todos ellos es el mismo, y depende de la disponibilidad de Ca^{2+} en el interior de la fibra muscular de la pared del vaso^{10,11}. El incremento de la concentración de Ca^{2+} existente en el citoplasma depende de la entrada de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares¹². En consecuencia, los fármacos antagonistas del calcio, cuyo mecanismo de acción fundamental se ha descrito como bloqueo de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales existentes en la membrana celular¹³, podrían producir una inhibición de la respuesta vasoconstrictora a diferentes aminas biógenas, neurotransmisores y otros agentes endógenos, los cuales podrían estar implicados en la patogenia del espasmo vascular cerebral.

El presente trabajo ha sido diseñado con el fin de aportar bases experimentales acerca de la fisiopatología del espasmo vascular cerebral y su terapéutica, con los siguientes objetivos: *a*) estudio del espasmo vascular cerebral inducido farmacológicamente por noradrenalina (NA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) y prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), y por líquido cefalorraquídeo (LCR) humano obtenido después de una HSA (LCR hemorrágico); *b*) estudio del efecto de diferentes fármacos antagonistas del calcio (nicardipina y nimodipina) sobre la tensión de la pared vascular, en ausencia o en presencia de tono activo inducido por $PGF2\alpha$, y *c*) estudio del posible efecto inhibitor de los mencionados fármacos antagonistas del calcio sobre el espasmo vascular cerebral inducido por NA, 5-HT, $PGF2\alpha$ y LCR hemorrágico.

Material y métodos

Preparación experimental

Los experimentos se realizan en segmentos de arteria cerebral media (ACM) de cabra dispuestos en un baño de órganos para el registro de tensión isométrica¹⁴. Los animales se sacrifican mediante inyección intravenosa (yugular) de 30 mEq de KCl. A continuación se extrae rápidamente el cerebro y se procede a la disección y aislamiento de ambas ACM, de las cuales se obtienen segmentos cilíndricos de 4 mm de longitud. A través de la luz vascular se introducen dos alambres de acero inoxidable de 125 μ m de diámetro: uno de ellos, fijo a la

pared del baño, mantiene al segmento en posición horizontal; el otro, móvil, se conecta a un transductor de tensión. La preparación queda sumergida en una cámara que contiene 3 ml de solución fisiológica de sales con la siguiente composición (en mM): NaCl, 120; KCl, 5,4; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,2; $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0; NaHCO_3 , 25; glucosa, 5,6 y EDTA, 0,01. La preparación se burbujea continuamente con una mezcla de oxígeno (95 %) y CO_2 (5 %), la cual confiere al medio un pH de 7,3-7,4. La temperatura en el líquido nutritivo se mantiene a 37 °C.

Procedimiento experimental

Mediante el desplazamiento del alambre móvil en sentido vertical, se aplica una tensión basal de 1 g a los segmentos vasculares. Esta tensión se reajusta cuando es necesario hasta que se mantiene constante, lo que sucede a los 60-90 minutos tras el montaje de la preparación. El líquido nutritivo se cambia cada 15 minutos aproximadamente.

Las curvas dosis-efecto para NA, 5-HT (10^{-8} – 10^{-5} M) y $\text{PGF}_2\alpha$ (10^{-7} – 3×10^{-5} M) se obtienen de forma acumulativa. El posible efecto vasoactivo del LCR humano normal (obtenido de pacientes con afecciones raquímedulares diversas en el momento de practicarles una punción lumbar diagnóstica) o hemorrágico (procedente de pacientes con HSA), se investiga añadiéndolo al baño, bien en una única dosis (0,3 ml), bien acumulativamente en 3 dosis de 0,1 ml cada una. Todas las muestras de LCR proceden de los Servicios de Neurología y Neurocirugía del Hospital La Fe. El volumen total añadido al baño no supera en ningún caso el 10 % de su capacidad, es decir, 0,3 ml. Cuando se investiga el posible efecto relajante de los fármacos antagonistas del calcio, las curvas dosis-efecto (10^{-10} – 10^{-4} M) se obtienen induciendo previamente un tono activo que se mantenga constante con una dosis (10^{-5} M) de $\text{PGF}_2\alpha$. El posible efecto inhibitor de los fármacos antagonistas del calcio sobre el incremento de la tensión producido por NA, 5-HT, $\text{PGF}_2\alpha$ y LCR hemorrágico, se estudia incubando los segmentos con estos fármacos durante 15-20 minutos con anterioridad a la obtención de las curvas dosis-efecto de NA, 5-HT y $\text{PGF}_2\alpha$, o de la adición de LCR hemorrágico.

En cada segmento se realizan varias curvas dosis-efecto, calculándose para cada una de ellas la ED_{50} y el efecto máximo. A partir de todos los resultados obtenidos se calcula la ED_{50}

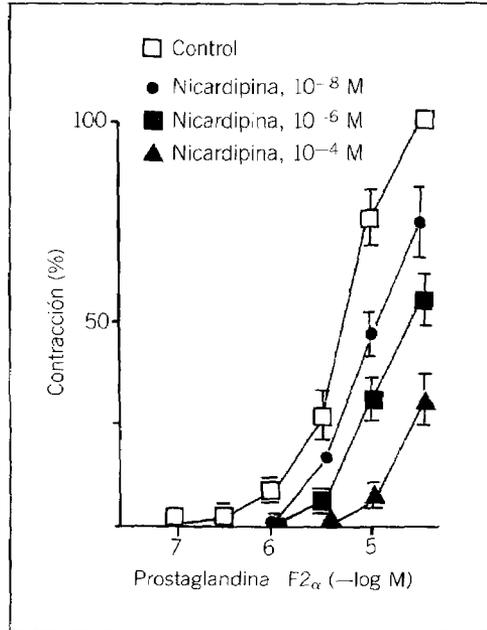


Fig. 1. Curvas dosis-efecto de prostaglandina $\text{F}_2\alpha$ sobre segmentos de arteria cerebral media, antes y durante la incubación con dosis crecientes de nicardipina. Los valores representan la media \pm EEM de los obtenidos en 7 experimentos.

media con sus intervalos de confianza y el efecto máximo medio \pm EEM (error estándar de la media). El análisis estadístico de los resultados se realiza mediante el test de la t de Student; un valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

Resultados

La adición al líquido del baño de NA, 5-HT y $\text{PGF}_2\alpha$ produjo contracción dosis-dependiente de los segmentos de ACM. Los valores de ED_{50} y efecto máximo para estos fármacos fueron, respectivamente, los siguientes: 9,1 ($5,7$ – $14,4$) $\times 10^{-7}$ M y 768 ± 119 mg para NA; 3,1 ($1,9$ – $4,9$) $\times 10^{-7}$ M y 1.928 ± 254 mg para 5-HT, y 5,2 ($3,3$ – $8,0$) $\times 10^{-6}$ M y 2.261 ± 389 mg para $\text{PGF}_2\alpha$. La adición de diferentes fármacos antagonistas del calcio (nicardipina y nimodipina) a los segmentos arteriales no tuvo efectos significativos sobre la tensión vascular basal (tensión pasiva). Por el contrario, su adición a segmentos de ACM previamente contraídos (tensión activa) produjo relajación dosis-

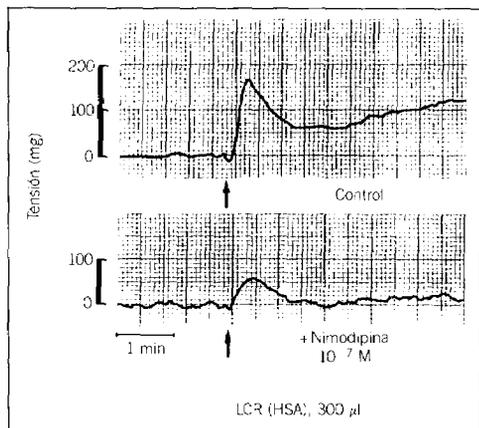


Fig. 2. Registros de la contracción isométrica de un segmento de arteria cerebral media inducida por líquido cefalorraquídeo (LCR) obtenido 8 días después de una hemorragia subaracnoide (HSA), en ausencia (registro superior) y en presencia (registro inferior) de nimodipina (10^{-7} M).

dependiente de los mismos. La preincubación de los segmentos arteriales con nicardipina y nimodipina (10^{-8} – 10^{-4} M) produjo inhibición dosis-dependiente de la contracción causada por NA, 5-HT y $\text{PGF}_2\alpha$. En la figura 1 se presentan, como ejemplo, los resultados obtenidos con $\text{PGF}_2\alpha$ y dosis crecientes de nicardipina.

La adición de LCR humano normal al líquido del baño no tuvo efecto sobre la tensión vascular basal. Por el contrario, el LCR hemorrágico produjo contracción de los segmentos de ACM, con dos componentes en el registro de tensión isométrica: un pico inicial transitorio seguido de una meseta de menor magnitud. La preincubación con nimodipina (10^{-7} M) produjo inhibición de ambos componentes de la contracción originada por el LCR hemorrágico (fig. 2).

Comentario

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el LCR obtenido de pacientes con HSA incrementa la tensión vascular. Por el contrario, el LCR normal no muestra vasoactividad alguna. La pequeña cantidad de LCR hemorrágico añadida al baño, la magnitud y la dosis-dependencia de la respuesta, así como la ausencia de respuesta frente al LCR normal, sugieren que esta actividad contráctil podría ser debida

a la presencia de un agente vasoconstrictor en el LCR hemorrágico¹⁵.

Resultados obtenidos en otras investigaciones han puesto de manifiesto que el LCR hemorrágico produce espasmo vascular cerebral en una amplia variedad de especies¹⁵⁻¹⁷. Sin embargo, el factor responsable de esta actividad contráctil es aún desconocido. Las evidencias experimentales sugieren la implicación de noradrenalina, 5-hidroxitriptamina, histamina y dopamina en la génesis del espasmo vascular cerebral. Además de estos neurotransmisores, también se ha sugerido que la hemoglobina, algunas prostaglandinas e hidropéroxidos lipídicos son posibles agentes espasmogénicos en el LCR hemorrágico⁹. Ya que muchas de estas sustancias tienen diferentes tipos de receptor en el músculo liso cerebrovascular, parece difícil bloquear, con antagonistas selectivos, la acción de todas ellas en una situación patológica. Por otra parte, se ha demostrado que la contracción mantenida que produce el LCR hemorrágico no se modifica por los antagonistas selectivos de noradrenalina, 5-hidroxitriptamina, acetilcolina, histamina o angiotensina II^{9,18}. En nuestros experimentos, la preincubación de los segmentos arteriales con antagonistas del calcio inhibe significativamente la vasoconstricción inducida por LCR hemorrágico, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores¹⁶.

Este efecto de los fármacos antagonistas del calcio es inespecífico, ya que una acción inhibitoria semejante se ejerce sobre las contracciones inducidas por otros estímulos tales como noradrenalina, 5-hidroxitriptamina, etc.^{10,19,20}, que desarrollan sus efectos a través de receptores específicos.

En conclusión, estos hallazgos experimentales demuestran que los fármacos antagonistas del calcio inhiben la vasoconstricción cerebral inducida por noradrenalina, 5-hidroxitriptamina y prostaglandina $\text{F}_2\alpha$, así como la inducida por LCR procedente de pacientes con HSA.

El trabajo que hemos expuesto constituye sólo parte de un amplio y ambicioso proyecto de investigación actualmente en curso, cuya finalidad es aportar bases experimentales al conocimiento del espasmo vascular cerebral. En consecuencia, todo avance en el conocimiento de los mecanismos básicos de la fisiopatología del espasmo vascular cerebral, puede suponer la adopción de nuevas actitudes terapéuticas que permitan un tratamiento más eficaz y, por lo tanto, una disminución de la morbilidad y mortalidad de este proceso patológico.

BIBLIOGRAFÍA

1. SIESJÖ BK. Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981; 1: 155-185.
2. PERES SERRA J. Enfermedades vasculares del cerebro. Barcelona, Sandoz, 1981.
3. FISHER CM, MOHR JP, ADAMS RD. Enfermedades cardiovasculares. En: Harrison, ed. *Medicina Interna*. México, Prensa Médica Mexicana, 1973; 1:928-1.969.
4. KURTZKE JF. The distribution of cerebrovascular diseases. En: Gillingham, Mawdsley, Williams, eds. *Stroke*. Londres, Churchill Livingstone 1976; 5-20.
5. ALMENAR F. Estudios de mortalidad de la Comunidad Autónoma Valenciana. Valencia, Publicaciones de la Dirección Provincial del Instituto Nacional de la Salud, 1985.
6. ARBIN M, BRITTON M, FAIRE U et al. A stroke unit in medical Department Organization and the first 100 patients. *Acta Med Scand* 1979; 205: 231-235.
7. KISTLER JF, LEES RS, CANDIA G et al. Intravenous nitroglycerin in experimental cerebral vasospasm. A preliminary report. *Stroke* 1979; 10: 26-29.
8. ENDO S, SUZUKI J. Experimental cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. Development and degree of vasospasm. *Stroke* 1977; 8: 702-707.
9. SASAKI T, ASANO T, TAKAKURA K, SANO K, KASELL NF. Nature of the vasoactive substance in CSF from patients with subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1984; 60: 1.186-1.191.
10. TOWART R. The selective inhibition of serotonin-induced contractions of rabbit cerebral vascular smooth muscle by calcium-antagonistic dihydropyridines. An investigation of the mechanism of action of nimodipine. *Circ Res* 1981; 48: 650-657.
11. TOWART R. The pathophysiology of cerebral vasospasm, and pharmacological approaches to its management. *Acta Neurochir* 1982; 63: 253-258.
12. BOLTON TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 1979; 59: 606-718.
13. FLECKENSTEIN A. Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1977; 17: 149-166.
14. NIELSEN KC, OWMAN C. Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res* 1971; 27: 33-42.
15. ALLEN GS, GROSS CJ, FRENCH LA, CHOU SN. Cerebral arterial spasm. Part 5: In vitro contractile activity of vasoactive agents including human CSF on human basilar and anterior cerebral arteries. *J Neurosurg* 1976; 44: 594-600.
16. BRANDT L, LJUNGGREN B, ANDERSSON KE et al. The effects of cerebrospinal fluid from patients with subarachnoid hemorrhage on cat pial arterioles in situ. *J Neurosurg* 1981; 54: 351-356.
17. KAYE AH, TAGARI PC, TEDDY PJ, ADAMS CBT, BLASO WP, BOULLIN DJ. CSF smooth-muscle constrictor activity associated with cerebral vasospasm and mortality in SAH patients. *J Neurosurg* 1984; 60: 927-934.
18. BOULLIN DJ, BRANDT L, LJUNGGREN B, TAGARI P. Vasoconstrictor activity in cerebrospinal fluid from patients subjected to early surgery for ruptured intracranial aneurysm. *J Neurosurg* 1981; 55: 237-245.
19. ALLEN GS, BANGHART SB. Cerebral arterial spasm. Part 9: In vitro effects of Nifedipine on Serotonin—, Phenylephrine— and Potassium-induced contractions of canine basilar and femoral arteries. *Neurosurgery* 1979; 4: 37-42.
20. EDVINSSON L, BRANDT L, ANDERSSON KE, BENGTSSON B. Effect of a calcium antagonist on experimental constriction of human brain vessels. *Surg Neurol* 1979; 11: 327-330.

DISCUSIÓN

- A. ORDINAS: Existe alguna razón especial por la que se escogió la prostaglandina F_{2α} para los experimentos *in vitro*? ¿Acaso se sospecha que ésta aparece en LCR después de la hemorragia?
- E. ALBORCH: La razón de su elección obedece a un doble motivo. En primer lugar existe la sospecha de que la prostaglandina implicada en la génesis del vasospasmo podría ser la F_{2α}, y en segundo lugar porque en nuestro modelo, al igual que en otros modelos experimentales, parece que esta prostaglandina es la que ejerce mayor actividad vascular y, por consiguiente, resulta adecuada para producir un aumento de tensión y poder obtener posteriormente las curvas de relajación.
- A. ORDINAS: ¿Cuál sería la procedencia de mediadores, tales como la serotonina o la noradrenalina, o la propia prostaglandina, F_{2α} que se supone podrían ser los causantes del vasospasmo?
- E. ALBORCH: Se ha sugerido que podrían tener un doble origen: por una parte el propio hematoma, y por otra el vaso lesionado.
- J. BIGORRA: Quisiera preguntar al Dr. Alborch si han estudiado el efecto de los bloqueadores alfaadrenérgicos en esta situación. Me gustaría también que comentara si disponen de datos en modelos *in vivo* de animal entero, puesto que el estudio del vasospasmo cerebral es relativamente difícil de llevar a cabo en el animal entero.

E. ALBORCH: Con respecto a la primera pregunta he de manifestarle que en nuestro laboratorio se han realizado estudios sobre el efecto de diferentes substancias vasoactivas como la serotonina, la noradrenalina, etc., así como la existencia de receptores específicos para estos agentes utilizando antagonistas específicos. La dificultad en relación con la terapéutica del vasospasmo estriba en que se desconoce cuál es exactamente el factor o factores responsables del vasospasmo, por lo que intentar bloquear de manera específica todas las posibles substancias implicadas sería complejo. Lo que nosotros pretendemos con la utilización de los fármacos antagonistas del calcio es buscar un efecto inespecífico capaz de actuar sobre cualquier estímulo contráctil de la pared vascular. El razonamiento sería el siguiente: aunque no se conoce con exactitud la etiología del vasospasmo, que probablemente sea multifactorial, se puede orientar su terapéutica teniendo en cuenta que el mecanismo final para todos los mecanismos de activación consiste en el incremento de la concentración de calcio intracelular y, en consecuencia, su disminución por bloqueo de la entrada de calcio a través de los canales existentes en la membrana celular realizado por los fármacos antagonistas del calcio puede resultar beneficiosa.

En cuanto a la segunda cuestión, he de manifestarle que efectivamente hemos realizado experimentos *in vivo*. Concretamente en relación con los fármacos antagonistas del calcio hemos estudiado el efecto *in vivo* en un cabra sin anestesiar, animal en el que en condiciones fisiológicas los fármacos antagonistas del calcio inyectados por vía intraarterial, muestran el siguiente efecto: dilatan los vasos y producen un incremento del flujo sanguíneo cerebral por disminución de la resistencia vascular cerebral, efecto que no se acompaña de reducción de la presión arterial sistémica. Además, inhiben la vasoconstricción cerebral producida por la administración intraarterial de noradrenalina y serotonina. La magnitud de ambos efectos, vasodilatador e inhibidor de la vasoconstricción, es diferente según el fármaco que se utilice en el experimento.

J. COSÍN: Siguiendo la línea de razonamiento expuesta por el Dr. Ordinas, me gustaría preguntar si se han realizado experimentos con LCR humano añadiéndoles hematíes en una proporción similar a la que pueda haber en el procedente de pacientes con hemorragia subaracnoide. Lo mismo sería aplicable a las

plaquetas, ya que probablemente la plaqueta sea un depósito muy importante de estos agentes vasoactivos. Además parece ser que recibe la orden de ponerse en movimiento para evitar que la hemorragia se extienda. Por lo menos en la circulación coronaria la plaqueta está adquiriendo una gran importancia en la fisiopatología del espasmo. ¿Se ha ensayado LCR con plaquetas activadas?

E. ALBORCH: No. Hasta ahora hemos utilizado LCR humano, tal como se obtiene del enfermo mediante punción lumbar diagnóstica, añadiéndolo al líquido del baño. En relación con su efecto, se ha especulado que el poder vasospástico del LCR podría ser utilizado como un criterio de evaluación clínica de evolución del vasospasmo. En este sentido, algunos autores afirman que cuanto mayor es el vasospasmo inducido por el LCR, peor será la evolución del paciente. No obstante, esta posible relación se encuentra todavía en fase de investigación.

J.E. FELIU: Me ha gustado mucho la presentación del Dr. Alborch y en concreto el estudio de los efectos que el LCR de pacientes con hemorragia subaracnoide tiene sobre este modelo experimental de arteria aislada. ¿Tiene usted idea, o tiene previsto estudiar qué fracción de qué peso molecular, qué producto contenido en este LCR podría ser responsable del efecto vasoconstrictor o espástico que usted detecta? En este sentido quizá técnicas de cromatografía, HPLC y análisis fraccionado del LCR podrían ser útiles para identificar la o las substancias que generan este cuadro que usted pone de manifiesto.

E. ALBORCH: Hasta ahora los estudios que hemos realizado han estado orientados a la identificación de estas substancias por procedimientos farmacológicos, aunque no descartamos establecer colaboraciones con otros grupos de trabajo de nuestro Centro de Investigación, que nos pudieran ayudar a investigar estas cuestiones con procedimientos experimentales diferentes a los que hemos utilizado hasta ahora.

J.M. LOPEZ VEGA: Quisiera preguntar si en los estudios en animal completo se ha visto alguna diferencia en cuanto a la capacidad relajante de los antagonistas del calcio utilizados por vía intravenosa o mediante instilación local, de cara a su posible utilización clínica en pacientes con hemorragia subaracnoide.

E. ALBORCH: Existe una importante diferencia entre las dos formas de administración. La administración de fármacos antagonistas del

calcio por vía intraarterial, generalmente intracarotídea, produce incremento del flujo sanguíneo cerebral sin efectos concomitantes sobre parámetros sistémicos, tales como presión arterial, frecuencia cardíaca, etc. Ahora bien, cuando se utiliza la vía intravenosa pueden enmascarse los efectos sobre los vasos cerebrales, puesto que coinciden con unos efectos sistémicos, fundamentalmente una disminución de la presión arterial. Este efecto sobre presión arterial es menor con unos fármacos antagonistas del calcio que con otros, probablemente debido a su mayor o menor selectividad sobre el lecho vascular cerebral.

J.M. LÓPEZ VEGA: Otro aspecto sería si la relajación inducida por antagonistas del calcio se consigue con una sola dosis y el efecto se prolonga en el tiempo, o bien es necesario repetir la administración de los fármacos para prolongar el efecto relajante en el animal, o en el caso de que esté estudiado, en el hombre.

E. ALBORCH: Los fármacos antagonistas del calcio tienen un efecto de duración limitada y, por lo tanto, para conseguir un efecto duradero es necesaria su administración continuada o pautada.

J. BIGORRA: Con respecto a la utilización clínica, quisiera comentar que se han publicado varios ensayos clínicos sobre los efectos de los antagonistas del calcio, fundamentalmente nimodipina, en la prevención y tratamiento del vasospasmo tras hemorragia subaracnoide, algunos de ellos aleatorios doble ciego y controlados con placebo. Es decir, la investigación clínica confirma los resultados que ha presentado el Dr. Alborch, aunque no se sepa exactamente cómo actúan estos fármacos, que

como se ha señalado tienen como característica la inespecificidad del efecto.

E. ALBORCH: Probablemente esta inespecificidad puede ser una de sus ventajas, no uno de sus inconvenientes, dado el carácter multifactorial que se cree tiene la etiología del vasospasmo tras hemorragia subaracnoide.

D. ANDREU: Quisiera preguntar al Dr. Alborch si en su opinión los hallazgos que acaba de presentar se podrían extrapolar a otras arterias cerebrales y en concreto a la arteria central de la retina.

E. ALBORCH: Es difícil establecer esta extrapolación por dos razones. En nuestro laboratorio hemos observado que en segmentos de arterias cerebrales diferentes a la cerebral media la respuesta no es igual, pero no solamente en el caso de los antagonistas del calcio, sino con la mayoría de los fármacos utilizados. La respuesta tanto a la estimulación con KCl, la noradrenalina, la serotonina, etc. varía mucho en función de la arteria cerebral elegida y dentro de un mismo vaso, por ejemplo la cerebral media, varía considerablemente según el segmento sea proximal o distal. Esta diferencia está probablemente fundamentada en diferencias morfológicas tales como densidad de inervación, tamaño de los vasos, etc. Por otra parte, en otra serie de experimentos que hemos realizado con arterias umbilicales humanas hemos observado que la magnitud de la respuesta a distintos fármacos antagonistas del calcio, así como a otros fármacos vasoactivos es diferente con respecto al efecto obtenido utilizando arterias cerebrales. Por todo ello considero que es difícil, arriesgado, extrapolar estos resultados a otros lechos vasculares.

Estudio de las células secretoras de inmunoglobulinas y su regulación en la púrpura de Schönlein-Henoch y nefropatía IgA

B. Casanueva

Laboratorio de Inmunología. Hospital Nacional Marqués de Valdecilla. Santander.

Introducción

La púrpura de Schönlein-Henoch (PSH) se caracteriza por el complejo clinicopatológico de exantema cutáneo purpúrico, sintomatología articular manifestada por artralgias o artritis, dolor cólico abdominal con o sin hemorragia gastrointestinal y afección renal, como principales manifestaciones de una vasculitis que afecta vasos de pequeño calibre¹. Su etiología es desconocida, pero la demostración en la inmunofluorescencia (IF) renal y cutánea de depósitos de inmunoglobulinas, fundamentalmente IgA², hizo pensar que complejos antígeno-anticuerpo guardarían relación con el desarrollo del proceso.

Estas sospechas se confirmaron con la demostración de niveles séricos elevados de IgA³, crioglobulinas⁴ y posteriormente de inmunocomplejos circulantes (ICC) formados fundamentalmente por anticuerpos del tipo IgA^{5,6}. Sin embargo, los datos existentes sobre las bases celulares que intenten explicar este aumento de IgA son escasos y en ocasiones discordantes. Sakai et al⁷ observan un aumento del número de linfocitos circulantes con IgA en su membrana; Beale et al⁸, un aumento policlonal de la síntesis de inmunoglobulinas por células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en situación basal y una disminución de esta síntesis tras estímulo con mitógeno de *pokeweed* (PWM), mientras Egido et al⁹, a diferencia de Beale, observan un aumento únicamente de IgA polimérica en sobrenadantes de cultivos de CMSP estimuladas con PWM. Por tanto, a pesar de que la IgA parece desempeñar un papel fundamental en la PSH, se desconocen las alteraciones celulares responsables de su síntesis en esta patología.

En 1968, Berger y Hinglais¹⁰ observaron la presencia de depósitos fundamentalmente mesangiales de IgA y en menor grado IgG en una serie de pacientes con proteinuria menor de 1 g/24 h y hematuria microscópica que se transformaba en macroscópica tras episodios de infección respiratoria de vías altas. Actualmente, la enfermedad de Berger o nefropatía IgA se define por la presencia de IgA en la inmunofluorescencia con o sin otras inmunoglobulinas, en ausencia de evidencia clínica o bioquímica de enfermedad sistémica, considerándose responsable de un 10-20 % de los casos de enfermedad renal terminal en adultos.

Como sucede en la PSH, la etiología es desconocida y también la IgA parece desempeñar un papel fundamental. Se han constatado niveles séricos elevados de IgA¹¹, depósitos de esta inmunoglobulina en la inmunofluorescencia renal y cutánea¹² y presencia de ICC formados por anticuerpos fundamentalmente del tipo IgA^{13,14}. Aunque existen más estudios sobre las bases celulares que tratan de explicar estas alteraciones, los datos son contradictorios.

Mientras Sakai et al¹⁵ encuentran un aumento del número de linfocitos circulantes con IgA en su membrana en pacientes y familiares de pacientes con enfermedad de Berger, Aino-Nakal et al y Fiorinni et al^{16,17} no son capaces de demostrar estas alteraciones en sus respectivas series. Tampoco existe acuerdo sobre las subpoblaciones T implicadas en estos trastornos; mientras algunos autores no encuentran alteraciones en la relación OKT4/OKT8¹⁸, otros observan un aumento de las células facilitadoras OKT4^{19,20}, o una disminución de las supresoras OKT8²¹. Por tanto, también en la enfermedad de Berger la IgA parece desempeñar un papel fundamental, sin que queden claras las

bases celulares reguladoras de los hallazgos comentados.

Aunque los datos sobre el tipo de IgA encontradas en las lesiones son discordantes^{22,23}, la mayoría de autores han observado IgA₁ en ambas entidades^{24,25}.

A la luz de los datos comentados, es evidente la existencia de similitudes entre estas dos enfermedades, que han llevado a numerosos autores a considerarlas variantes de una misma entidad nosológica, con mecanismos patogénicos análogos. Sin embargo, la presencia de manifestaciones clínicas extrarrenales y la evolución generalmente aguda y autolimitada de la PSH, en contra de la evolución crónica de la enfermedad de Berger, hacen sospechar que deben existir diferencias, y más cuando autores como Kauffman et al²⁶ han observado que los ICC envueltos en la patogenia de ambas enfermedades parecen distintos en tamaño y características. Además, se desconocen en realidad las bases celulares de las alteraciones observadas.

Por este motivo nos propusimos estudiar una serie de pacientes con PSH y enfermedad de Berger, determinando el número de células circulantes secretoras de cada clase de inmunoglobulina y la posible existencia de anomalías en los mecanismos reguladores de esta síntesis mediante: *a)* respuesta al PWM; *b)* respuesta tras estímulo inducido por el cultivo mixto autólogo (CMA), y *c)* valoración de la activación funcional de linfocitos T autólogos generados tras estímulo con concanavalina A. Por otro lado, estudiamos la posible existencia de correlación entre actividad clínica y respuesta inmunológica observada. Además, comprobamos la especificidad de los hallazgos obtenidos, mediante comparación de los resultados con controles normales, individuos portadores de infección respiratoria de vías altas, proceso implicado como desencadenante ocasional de la enfermedad y modelo de estímulo antigénico en mucosas y pacientes con otra vasculitis leucocitoclástica distinta de la PSH.

Pacientes y métodos

Se estudiaron 64 pacientes diagnosticados de PSH, por la presencia, junto al exantema cutáneo típico, de al menos dos de las tres manifestaciones clínicas siguientes: *a)* afectación articular (artralgias/artritis); *b)* sintomatología abdominal (dolor abdominal, vómitos, hemorragia), y *c)* afectación renal (hematuria ≥ 10 hematíes/c; proteinuria ≥ 50 mg/24 h). La enfermedad se consideró activa en 28 pacientes

(20 varones y 8 mujeres, con una edad media de $10,3 \pm 13,7$ años, rango: 3-78 años), al presentar junto al exantema cutáneo típico al menos dos de las tres afectaciones clínicas fundamentales. En 11 de ellos, la biopsia cutánea mostraba una vasculitis leucocitoclástica y en 10 existía afectación renal con hematuria, que se asociaba a proteinuria menor de 1 g/24 h en 4 individuos. Mostraban síntomas articulares 27 pacientes y alteraciones gastrointestinales, 24 pacientes.

La enfermedad se consideró inactiva en 46 pacientes (30 varones y 16 mujeres con una edad media de $11,2 \pm 7,9$ años, rango: 3-40 años), que habiendo padecido un cuadro clínico típico de PSH se encontraban completamente asintomáticos y sin afectación renal. Diez casos se estudiaron tanto en la fase activa como durante su inactividad.

Dentro de la enfermedad de Berger se incluyeron 33 pacientes (24 varones y 9 mujeres, con una edad media de $19,2 \pm 12,5$ años, rango: 4-57 años), que en la biopsia renal presentaban depósitos de IgA demostrados por inmunofluorescencia, con o sin otras inmunoglobulinas, en ausencia de evidencia clínica o bioquímica de enfermedad sistémica. La duración media de la enfermedad era de 6,4 años, y el estudio se realizaba en un momento cualquiera de evolución de la enfermedad, no coincidente o inmediatamente siguiente a exacerbación de la hematuria por IRVA, infección respiratoria de las vías altas, gastroenteritis u otro tipo de proceso. En el momento del estudio todos presentaban algún grado de hematuria, que en 14 casos se asociaba a ligera proteinuria, cuatro mostraban hipertensión arterial ligera y en ningún caso existía fallo renal.

Los resultados obtenidos se compararon con los de 77 controles normales, divididos en grupos de edad y sexo similares a las poblaciones de PSH y enfermedad de Berger.

Dentro del grupo con infección respiratoria de vías altas se incluían 27 individuos, diagnosticados entre 3 y 7 días antes de su estudio de faringitis o infección respiratoria (16 mujeres y 11 varones), con una edad media de $13 \pm 12,1$ años, rango: 2-39 años).

Por último se estudiaban 10 casos diagnosticados mediante biopsia cutánea de vasculitis leucocitoclástica distinta de la PSH.

Para determinar el número de células circulantes secretoras de inmunoglobulinas y sus cifras tras estímulo policlonal con PWM, se obtenían las CMSP de sangre venosa heparinizada mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-

TABLA I
NÚMERO DE CÉLULAS CIRCULANTES SECRETORAS DE INMUNOGLOBULINAS

Poblaciones	Nº de casos	Edad media	Sexo (V/M)	Número de células secretoras de inmunoglobulinas/10 ⁶ CMSP		
				IgG	IgA	IgM
PSH activa	28	10,3	20/8	79×5,9	1044×1,5	248×2,6
PSH inactiva	46	11,2	30/16	43×4,2	343×2,0	123×2,2
Controles PSH	22	7,8	12/10	68×4,2	336×1,7	143×2,0
IRVA	27	13,0	11/16	86×4,0	519×1,7	175×3,4
VL	10	53,6	5/5	34×3,0	309×1,5	87×2,0
EB	23	21,1	16/7	94×4,4	657×1,8	120×2,3
Controles EB	44	22,6	27/17	30×3,4	327×1,7	117×2,0

PSH: púrpura de Schönlein-Henoch; IRVA: infección respiratoria de las vías altas; VL: vasculitis leucocitoclástica; EB: enfermedad de Berger; CMSP: células mononucleares en sangre periférica.

TABLA II
RESPUESTA INDUCIDA TRAS ESTÍMULO POLICLONAL CON PWM

Poblaciones	Nº de casos	Número de células secretoras de inmunoglobulinas/10 ⁶ CMSP		
		IgG	IgA	IgM
PSH activa	18	5.800×1,9	3.999×2,3	9.208×2,7
PSH inactiva	34	5.467×2,2	4.019×2,3	8.206×2,2
Controles PSH	15	5.519×1,8	4.005×1,6	8.289×2,1
EB	24	6.839×2,0	5.427×1,9	6.739×2,2
Controles EB	40	7.070×2,0	5.509×1,7	8.331×2,2

PSH: púrpura de Schönlein-Henoch; EB: enfermedad de Berger; CMSP: células mononucleares en sangre periférica.

Hypaque²⁷, cuantificando el número de células secretoras mediante ensayo hemolítico con proteína A de estafilococo o *plaque forming cell assay* (PFC). Una parte de estas CMSP se mantenían en cultivo durante 7 días estimuladas con 10 µg/ml de PWM. Posteriormente eran recogidas y calculado el número de células secretoras tras dicho estímulo policlonal mediante el PFC.

Para estudiar las células secretoras tras cultivo mixto autólogo, las CMSP se separaban en subpoblaciones T y no-T mediante formación de rosetas con hematíes de carnero (SRBC) previamente tratados con S-2-aminoetil-isotiouronio-bromida-hidrobromida (AET). La pureza de las poblaciones obtenidas se comprobó por medio de la formación de rosetas E²⁸, inmunoglobulinas de superficie por inmunofluorescencia²⁹ y tratamiento con alfa-naftil-acetatoesterasa³⁰. El cultivo mixto autólogo se realizó de acuerdo con el método descrito por Gatenby et al³¹.

La actividad T supresora tras estímulo con concanavalina A se estudiaba mediante un cultivo autólogo compuesto por células T esti-

muladas o no con concanavalina A durante 48 horas y células B autólogas, que posteriormente se mantenían durante 6 días en cultivo estimulado con PWM. A continuación, se cuantificaba el número de células secretoras mediante el PFC.

La técnica del PFC se realizó según una modificación de Hammarstrom et al³², que utiliza SRBC a los que se ha adherido proteína A de estafilococo como células indicadoras, antiinmunoglobulina humana de conejo específica y complemento de cobayo.

Para la presentación de los datos se escogió la media geométrica ± DE, como el método más apropiado. La significación de las diferencias en el número de PFC entre los grupos se analizó mediante ANOVA y test de Tukey.

Resultados

Los resultados sobre el número de células circulantes secretoras de inmunoglobulinas en los distintos grupos se presentan en la tabla I.

TABLA III
NÚMERO DE CÉLULAS SECRETORAS GENERADAS TRAS CULTIVO MIXTO AUTÓLOGO

Poblaciones	Nº de casos	PFC-IgA	PFC-IgG	PFC-IgM
Controles	18	752 ± 1,8	288 ± 6,8	230 ± 3,0
PSH inactiva	12	1223 ± 1,6	659 ± 4,5	641 ± 2,9
EB	17	1689 ± 2,0	872 ± 2,5	280 ± 2,5

PSH: púrpura de Schönlein-Henoch; EB: enfermedad de Berger; PFC: *plaque forming cell assay*.

TABLA IV
ACTIVIDAD SUPRESORA GENERADA TRAS ESTÍMULO CON CONCAVALINA A Y CULTIVO AUTÓLOGO

PFC-IgG	T Con A + B + PWM	T sin Con A + B + PWM	I-E(%)
Controles	2.790 ± 1,9	5.632 ± 2,1	50,4 (I)
EB	5.156 ± 3,5	4.635 ± 2,6	11,2 (E)
PSH inactiva	3.681 ± 2,1	5.985 ± 1,7	38,5 (I)
PFC-IgA			
Controles	2.380 ± 1,7	4.310 ± 2,5	44,8 (I)
EB	4.662 ± 2,9	4.296 ± 3,2	8,5 (E)
PSH inactiva	2.195 ± 2,2	3.124 ± 1,7	29,7 (I)
PFC-IgM			
Controles	2.633 ± 1,9	5.362 ± 4,8	50,9 (I)
EB	4.332 ± 3,3	4.261 ± 2,2	1,7 (E)
PSH inactiva	3.334 ± 2,4	4.989 ± 2,5	33,2 (I)

PSH: púrpura de Schönlein-Henoch; EB: enfermedad de Berger; PFC: *plaque forming cell assay*; I: inhibición; E: estimulación.

El número de células circulantes secretoras de IgA en la PSH activa era significativamente mayor que el observado en la PSH inactiva ($p < 0,001$), que en los controles normales ($p < 0,001$), individuos con infección respiratoria de las vías altas ($p < 0,001$) y casos con vasculitis leucocitoclástica. El número de células circulantes secretoras de IgM en la PSH activa era también estadísticamente superior a las cifras encontradas en el resto de los grupos. En la enfermedad de Berger el número de células circulantes secretoras de IgG ($p < 0,005$) e IgA ($p < 0,001$) eran estadísticamente superiores a los encontrados en los controles normales.

La respuesta inducida tras estímulo policlonal con PWM se representa en la tabla II.

No existían diferencias significativas entre ninguna de las poblaciones estudiadas tras este estímulo policlonal.

Con objeto de profundizar sobre posibles alteraciones de la regulación en la síntesis de inmunoglobulinas en estos procesos, se estudiaron el número de células secretoras generadas tras cultivo mixto autólogo. Los resultados se presentan en la tabla III.

El número de células secretoras de IgA generadas tras cultivo mixto autólogo era significativamente mayor en la enfermedad de Berger que en los controles normales ($p < 0,01$). No se encontraron diferencias para el resto de enfermedad de células secretoras de inmunoglobulinas.

La actividad supresora generada tras estímulo con concanavalina A y cultivo autólogo se estudió en 15 pacientes con enfermedad de Berger, 10 individuos que habían padecido PSH y 8 controles normales. Los resultados se muestran en la tabla IV, expresándose en porcentajes de inhibición (I) o estimulación (E). Para su cálculo se aplicó la fórmula:

Porcentaje de I-E = $100 - (\text{n.º de PFC concanavalina A} / \text{n.º PFC sin concanavalina A} \times 100)$

Comentario

Como se deduce de estos resultados, el estímulo con concanavalina A no fue capaz de generar actividad supresora en la enfermedad de Berger a diferencia de lo que ocurría en la PSH y en los controles normales. Nuestro estudio demuestra que, en los pacientes con PSH, durante

la fase activa existe un aumento en el número de células circulantes secretoras de IgA y en menor grado IgM, que persiste durante la fase de actividad clínica del proceso. Este dato apoya un posible papel patogénico de esta inmunoglobulina en la enfermedad, en concordancia con su observación en las lesiones cutáneas y renales² y con la demostración de niveles elevados de ICC conteniendo anticuerpos fundamentalmente del tipo IgA^{5,6}.

El aumento del número de células secretoras de IgA no se ha observado en otros tipos de vasculitis leucocitoclástica, por lo que su determinación puede tener utilidad para el diagnóstico diferencial de la PSH.

También en los países con enfermedad de Berger se ha observado un aumento en el número de células circulantes secretoras de IgA, independiente del tiempo de evolución de enfermedad, grado de hematuria, proteinuria y datos de la inmunofluorescencia renal.

La respuesta B en el cultivo mixto autólogo apoya la existencia de anomalías en los mecanismos reguladores de la producción de anticuerpos en la enfermedad de Berger. Nuestros hallazgos podrían interpretarse como el resultado de una excesiva proliferación de células T₄, como un defecto en las influencias supresoras de los linfocitos T₈ y/o monocitos o alternativamente por la existencia de una hiperactividad B como defecto primario. A este respecto se han descrito en la enfermedad de Berger distintas anomalías en la cooperación T-B. Algunos autores han observado un aumento de la relación IKT4/OKT8 debido a una disminución de la subpoblación OKT8²¹, un incremento de la OKT4^{19,20} o por una combinación de las anteriores²⁰. Otros autores no han encontrado alteraciones en estas subpoblaciones celulares¹⁸. Estas diferencias podrían explicarse por varios motivos, como la diferente fase de actividad de la enfermedad al realizar el estudio, por la ausencia de una única función celular en las subpoblaciones definidas por anticuerpos monoclonales o por los pocos clones de ambas subpoblaciones envueltos en la secreción de IgA.

Con objeto de profundizar en estas posibles alteraciones, estudiamos la actividad funcional T supresora generada tras estímulo con concanavalina A en estos pacientes. Es evidente que en nuestro ensayo la concanavalina A generaba, tanto en los controles como en los casos con PSH, una actividad supresora que disminuía la respuesta B al estímulo inducido por PWM, de forma similar a la observada por otros autores.

Por el contrario, en la enfermedad de Berger, en lugar de generar supresión la concanavalina A producía una respuesta estimuladora opuesta a la de los controles. Este hallazgo estaría parcialmente de acuerdo con los de Egidio et al²⁰, que han descrito alteraciones en la generación de células supresoras específicas para la IgA tras estímulo con concanavalina A. Estos mismos autores sospechan que la alteración podría ser secundaria a un aumento de la actividad T facilitadora. Sin embargo, la similitud de respuesta con la población control observada en nuestro ensayo tras el cocultivo sin estimular con concanavalina A, frente al fracaso en la generación de supresión en el cocultivo estimulado, apoya la sospecha de que la alteración radicaría fundamentalmente en una respuesta primariamente alterada de los linfocitos T a la concanavalina A. Nuestros hallazgos estarían de acuerdo con los estudios de Rothschild y Chatenau³³, que sugieren un déficit de función supresora en algunos pacientes al encontrar un aumento de la síntesis de IgA por CMSP deplecionadas de la subpoblación OKT8⁺. Esta disminución de actividad supresora, al igual que en nuestras observaciones, no estaría restringida a un único tipo de inmunoglobulina, y tampoco se encontraría en todos los pacientes estudiados. También Cagnoli et al³⁴, mediante estudio con anticuerpos monoclonales OKT4 y OKT8, detectan en algunos pacientes una reducción de la actividad supresora, mientras que en otros casos aprecian aumento de la actividad facilitadora específica o hiperactividad B específica para IgA. Esta disuniformidad de hallazgos se justificaría por una posible heterogeneidad de pacientes dentro de la enfermedad de Berger y de las subpoblaciones linfocitarias incluidas dentro de las OKT4 y OKT8.

Una explicación alternativa, como la existencia de una disminución de la actividad supresora de los monocitos, no parece probable, ya que se sabe que los monocitos no desempeñan un papel importante en la respuesta a la concanavalina A, y que los factores secretados por estas células en presencia del mitógeno están implicados en la proliferación T y no en la inhibición de producción de inmunoglobulinas por células B³⁵.

En la PSH, el número de células secretoras de inmunoglobulinas tras cultivo mixto autólogo, aunque algo más elevado que el obtenido en los controles, no mostraba diferencias estadísticamente significativas. La concanavalina A generaba en este grupo una actividad supresora ligeramente inferior a la encontrada en los con-

troles normales, sin que tampoco en este caso la diferencias resultaran significativas. Algunos autores han descrito en la PSH un defecto celular supresor similar al observado en el lupus eritematoso sistémico⁸. Nuestros datos estarían más acordes con los resultados obtenidos por Clarkson et al³⁶, que observan la desaparición de este efecto supresor tras plasmáfesis, lo que sugiere que factores solubles, ICC o anticuerpos contra células T pueden ser los responsables de esta modulación alterada.

La observación del desarrollo del cuadro tras infecciones respiratorias altas y de que la IgA encontrada en las lesiones sean dímeros o polímeros fundamentalmente de IgA₁²⁴ hace pensar en un origen mucoso para esta IgA depositada en las lesiones. A este respecto, Egido et al³⁷ han observado en amígdalas de pacientes con enfermedad de Berger un incremento en el número de linfocitos portadores de IgA, con inversión de la relación IgA/IgG, y un incremento de la producción de IgA polimérica tras estímulo con PWM similar a la observada en CMSP de estos pacientes. Kawanishi et al³⁸ han demostrado que algunas clonas de células T de las placas Peyer (PP) del ratón, estimuladas con concanavalina A, son capaces de inducir transformación de células B portadoras de IgM de superficie (IgMs) a células B con IgA de superficie (IgAs) sin modificar la población portadora de IgG. Esta subpoblación es capaz de colaborar en la producción de anticuerpos del tipo IgA cuando se cultivan con células B purificadas y antígeno, han mostrado expresar receptores Fc α y aumentar la síntesis de IgA en cultivos estimulados con PWM. Los pacientes con enfermedad de Berger presentan un aumento en el número de linfocitos circulantes portadores de RFc α ³⁹ y un mecanismo por el que clonas T de PP promueven cambios de células B IgMs⁺ a la expresión de IgAs es vía producción de RFc. Además se sabe que la mayoría de linfocitos T RFc α presentan fenotipo supresor/citotóxico (OKT8⁺) y su expresión puede ser inducida por IgA dimerica.

A la luz de nuestros hallazgos y de los datos aquí comentados, una hipótesis sugestiva entendería la patogenia de al menos ciertos casos de enfermedad de Berger por la existencia de alteraciones en clonas supresoras T en mucosas, que tras estímulo antigénico promoverían cambios de células B IgMs a la expresión de IgAs, aumentando el número de células secretoras de IgA₁ dimerica o polimérica y expresando RFc α , no descartándose que la heterogeneidad existente en este proceso implique

otras alteraciones inmunitarias en algunos casos. Que esta alteración resulte persistente podría explicarse por una predisposición genéticamente adquirida, que justificaría las anomalías observadas en familiares de estos pacientes, o por el mantenimiento permanente de una función alterada de las clonas T una vez activadas por el antígeno. A este respecto se ha observado *in vitro* que clonas T de las PP pueden mantenerse en cultivo durante extensos períodos de tiempo sin perder su actividad⁴⁰.

En la enfermedad de Berger, nuestras observaciones apoyarían la existencia de anomalías en los mecanismos de cooperación celular reguladores de la síntesis de IgA, probablemente genéticamente adquiridos, y que residirían al menos parcialmente en un fallo en la generación de supresión, permitiendo explicar el curso crónico de la enfermedad. En la PSH la respuesta inmunitaria podría estar alterada para algunos antígenos, diferentes en distintos pacientes, y que permitirían explicar las alteraciones producidas en la síntesis de IgA durante la fase aguda de la púrpura, justificando el curso habitualmente agudo y autolimitado.

BIBLIOGRAFÍA

1. CUPPS TR, FAUCI AS. The vasculitides. Vol 21. Major problems in Internal Medicine. W.B. Saunders. 1981; 61.
2. BAART DE LA FAILLE-KJIPER EH, KATER L, KOOSKER CJ, MEES EJD. IgA-deposits in cutaneous blood-vessel walls and mesangium in Henoch-Schönlein syndrome. Lancet 1973; 1: 892-893.
3. TRYGSTARD CW, STIEHM ER. Elevated serum IgA globulin in anaphylactoid purpura. Pediatrics 1971; 47: 1.023-1.028.
4. GARCIA-FUENTES M, CHANTLER C, WILLIAMS G. Cryoglobulinaemia in Henoch-Schönlein purpura. Br Med J 1977; 2: 163-165.
5. LEVINSKY RJ, BARRAT TM. IgA immune complexes in Henoch-Schönlein purpura. Lancet 1979; 2: 1.100-1.103.
6. HALL RP, LAWLEY TJ, HECK JA, KATZ SI. IgA-containing circulating immune complexes in dermatitis herpetiformis, Henoch-Schönlein purpura, systemic lupus erythematosus and other diseases. Clin Exp Immunol 1980; 40: 431-437.
7. KUNO-SAKAI H, SAKAI H, NOMOTO Y, TAKAKURA I, KIMURA M. Aumento de la cifra de linfocitos con IgA en su membrana en sangre periférica de niños afectados por púrpura de Schönlein-Henoch. Pediatrics (ed. esp) 1979; 8: 419-423.
8. BEALE MG, NAS-I GS, BERTOVICH MJ, MACDERMOTT RP. Similar disturbances in B cell activity and regulatory T cell function in Henoch-Schönlein purpura and systemic lupus erythematosus. J Immunol 1982; 128: 486-491.

9. EGIDO J, SANCHO J, MAMPASO F et al. A possible common pathogenesis of the mesangial IgA glomerulonephritis in patients with Berger's disease and Schönlein-Henoch syndrome. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 1980; 17: 660-666.
10. BERGER J, HINGLAIS N. Les dépôts intercapillaires d'IgA-IgG. *J Urol Nephrol* 1968; 74: 694-695.
11. WHITWORTH JA, LEIBOWITZ S, KENNEDY MC, CAMERON JS, CHANTLER C. IgA and glomerular disease. *Clin Nephrol* 1976; 5: 33-36.
12. MCCOY RC, ABRAMOWSKY CR, TISHER CC. IgA nephropathy. *Am J Pathol* 1974; 76: 123-140.
13. WOODROFFE AJ, GORMLY AA, MCKENZIE PE, WOOTTON AM, THOMPSON AJ, SEYMOUR AE, CLARKSON AR. Immunologic studies in IgA nephropathy. *Kidney Int* 1980; 18: 336-374.
14. MUSTONEN J, PASTERNAK A, HELIN H et al. Circulating immune complexes, the concentration of serum IgA and the distribution of HLA antigens in IgA nephropathy. *Nephron* 1981; 29: 170-175.
15. SAKAI H, NOMOTO Y, ARIMORI S, KOMORI K, INOUE H, TSUJI K. Increase of IgA-bearing peripheral blood lymphocytes in families of patients with IgA nephropathy. *Am J Clin Pathol* 1979; 72: 452-456.
16. ALNO-NAKHAL M, ANDRE JPS, HOUSSIN A, HUREZ D. Augmentation ou non du nombre de lymphocytes B porteurs d'IgA dans la maladie de Berger. *Nouv Presse Med* 1981; 10: 2.583.
17. FIORINI G, FORNASIERI A, SINICO R et al. Lymphocyte population in the peripheral blood from patients with IgA nephropathy. *Nephron* 1982; 31: 354-357.
18. CAGNOLI L, TABACCHI P, PASQUALI S, CENCI M, SASDELLI M, ZUCCHELLI P. T cell subset alterations in idiopathic glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* 1982; 50: 70-76.
19. D'AMICO G. Idiopathic mesangial IgA nephropathy. In: *Glomerular Injury 300 years after Morgagni*. Ed. Bertani T, Remuzzi G, Milano Wichtig 1983; 205.
20. EGIDO J, BLASCO R, SANCHO J, LOZANO L. T-cell dysfunctions in IgA nephropathy: Specific abnormalities in the regulation of IgA synthesis. *Clin Immunol Immunopathol* 1983; 26: 201-212.
21. HATENAUD L, BACH MA. Abnormalities of T cell subsets in glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 1981; 20: 267-270.
22. ANDRE C, BERTHOUX FC, ANDRE F, GUILLON J, GENIN C, SABATIER JC. Prevalence of IgA2 deposits in IgA nephropathies. A clue to their pathogenesis. *N Engl J Med* 1980; 303: 1343-1346.
23. CONLEY ME, COOPER MD, MICHAEL F. Selective deposition of immunoglobulin A1 in IgA nephropathy, anaphylactoid purpura nephritis and systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1980; 66: 1.432-1.436.
24. VALENTIN RM, RALD I, HAAMAN JJ, DAHA MR, VAN ES LA. Circulating macromolecular IgA1 and mesangial secretory component binding IgA1 in primary IgA nephropathy. *Kidney Int* 1983; 24: 408.
25. HALL RP, STACHURA I, CASON J, WHITESIDE TL, LAWLEY TJ. IgA-containing immune complexes in patients with IgA nephropathy. *Am J Med* 1983; 74: 56-63.
26. KAJFFMAN RH, VAN ES LA, DAHA MR. The specific detection of IgA immune complexes. *J Immunol Methods* 1981; 40: 117-121.
27. BOYUM A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: suppl 97, 77-89.
28. KAPLAN ME, CLARK C. An improved rosetting assay for detection of human T-lymphocytes. *J Immunol Methods* 1974; 5: 131-136.
29. AMMAN AJ, BORG D, KONDO L, WARA DW. Quantitation of B cells in peripheral blood by polyacrylamide beads coated with anti-human chain antibody. *J Immunol Methods* 1977; 17: 365-371.
30. YAM LT, LI CY, CROSBY WH. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am J Clin Pathol* 1971; 55: 283-289.
31. GATENBY PA, KOTZIN BL, ENGLEMAN EG. Induction of immunoglobulin-secreting cells in the human autologous mixed leukocyte reaction: regulation by helper and suppressor lymphocyte subsets defined with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1981; 127: 2.130-2.135.
32. HAMMARSTROM L, BIRD AG, BRITTON S, SMITH CIE. Pokeweed mitogen-induced differentiation of human B cells: evaluation by a protein A haemolytic plaque assay. *Immunology* 1979; 38: 181-189.
33. ROTHSCHILD E, CHATENAUD L. T cell subset modulation in immunoglobulin production in IgA nephropathy and membranous glomerulonephritis. *Kidney Int* 1984; 25: 557-564.
34. CAGNOLI L, BELTRANDI E, PASQUALI S et al. B and T cell abnormalities in patients with primary IgA nephropathy. *Kidney Int* 1985; 28: 646-651.
35. SMOLEN JS, CHUSED TM, NOVOTNY EA, STEINBERG AD. The human autologous mixed lymphocyte reaction. III. Immune circuits. *J Immunol* 1982; 129: 1.050-1.053.
36. CLARKSON AR, WOODROFFE AJ, BANNISTER KM, LOMAX-SMITH JD, AARONS I. The syndrome of IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 1984; 21: 7-14.
37. EGIDO J, BLASCO R, LOZANO L, SANCHO J, GARCIA-HOYO R. Immunological abnormalities in the tonsils of patients with IgA nephropathy: inversion in the ratio of IgA/IgG bearing lymphocytes and increased polymeric IgA synthesis. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 101-106.
38. KAWANISHI H, SALTMAN LE, STROBER W. Mechanisms regulating IgA class-specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissues. I. T cells derived from Peyer's Patches that switch sIgM B cells to sIgA B cells in vitro. *J Exp Med* 1983; 157: 433-450.
39. ADACHI M, YODOI J, MASUDA T, TAKASUKI K, UCHINO H. Altered expression of lymphocyte Fc receptor in selective IgA deficiency and IgA nephropathy. *J Immunol* 1983; 131: 1.246-1.251.
40. KIYONO H, MCGHEE JR, MOSTELLER LM et al. SM. Murine Peyer's Patch T cell clones. Characterization of antigen-specific helper T cells for immunoglobulin A response. *J Exp Med* 1982; 156: 1.115-1.130.

DISCUSIÓN

A. ORDINAS: Quiero felicitar al doctor Casanueva por esta amplia casuística de dos enfermedades que realmente son poco frecuentes en nuestro ambiente médico.

Quisiera preguntarle si ha observado correlación entre alguno de los parámetros evaluados en su estudio y la afectación renal, por otra parte no excesivamente frecuente, en pacientes con púrpura de Schönlein-Henoch.

B. CASANUEVA: Nuestro estudio incluía pocos casos de púrpura de Schönlein-Henoch con afectación renal, por lo que no evaluamos la posible relación entre el número de células circulantes secretoras de inmunoglobulinas y este dato clínico. Observamos que en tres de los 4 pacientes que presentaron afectación renal, el número de células circulantes secretoras de IgA se mantuvo elevado durante todo el estudio de seguimiento, que fue de un año. Este hallazgo podría tener cierta implicación patogénica y servir tal vez como parámetro de control de estos pacientes. A diferencia de los casos con afectación renal, el número de células circulantes secretoras de IgA en aquellos pacientes que no la desarrollaron, disminuía en el estudio de seguimiento, permaneciendo en límites normales.

J.V. CASTELL: ¿Cómo es posible que no exista relación entre esta inmunoglobulina y los niveles séricos? Es algo que me ha llamado la atención.

B. CASANUEVA: Efectivamente no encontramos correlación entre el número de células circulantes secretoras de IgA y los niveles séricos de esta inmunoglobulina. La mayor parte de la IgA sérica es monomérica y sólo un 10-15 % se halla en forma de polímeros. Los estudios sobre producción de ambas formas de IgA en tejidos humanos muestran que la IgA monomérica es sintetizada fundamentalmente en medula ósea y bazo. Además, la IgA del suero está formada en un 90 % de IgA₁ y un 10 % de IgA₂, proporción similar a la encontrada en la medula ósea. Aunque la contribución de cada uno de los compartimientos celulares a la cifra de IgA circulante no está aclarada, los datos comentados hacen pensar que la mayor parte de la IgA sérica estaría sintetizada por células plasmáticas de bazo y medula ósea. Se sabe que las células B de amígdalas, ganglios linfáticos y sangre periférica secretan proporciones similares de IgA monomérica y polimérica, composición diferente a la encontrada en el suero. Nosotros de-

terminamos el número de linfocitos B circulantes secretores de IgA, con un origen distinto en su mayor parte que el de la IgA sérica.

J.V. CASTELL: Una matización al respecto. ¿Han sido estimuladas estas células para el experimento de formación de placas?

B. CASANUEVA: Nosotros lo hicimos de varias formas. En primer lugar estudiamos el número de células circulantes secretoras de inmunoglobulinas en condiciones basales, sin estímulo. Existía un aumento de las secretoras de IgA y no existía correlación entre su número y los niveles séricos de inmunoglobulinas. Posteriormente, determinábamos la respuesta tras diferentes estímulos con mitógenos, como el pokeweed y la concanavalina A, y también tras cultivo mixto autólogo.

J.V. CASTELL: El motivo de la pregunta era la posibilidad de que fueran las propias condiciones del ensayo las que de alguna forma hubieran condicionado una respuesta anormal, aunque por lo que usted ha comentado parece que no fue así. Es decir, que en condiciones basales existe realmente un mayor número de células secretoras y que además éstas están secretando más IgA.

B. CASANUEVA: Sí. En sangre periférica de estos pacientes observamos un aumento del número de células secretoras de IgA. El problema residiría en cómo interpretar los otros resultados obtenidos en el laboratorio. Es evidente que tanto tras estímulo policlonal con PWM, como en los estudios de la función T supresora con concanavalina A, o de la respuesta al cultivo mixto autólogo, existía siempre una población control en la que las condiciones del ensayo eran idénticas a las de los pacientes. Además, en el estudio con la concanavalina A separamos células T estimuladas y sin estimular con el mitógeno, observando que los valores obtenidos para la generación de placas con células T no estimuladas eran similares, tanto para los pacientes con púrpura de Schönlein-Henoch como para los controles normales y los casos de nefropatía IgA. Sin embargo, tras estímulo supresor la respuesta es completamente distinta, y mientras en los controles y pacientes con púrpura se produce una disminución de la respuesta, en los casos de nefropatía IgA la concanavalina A produce una estimulación en la generación de placas. Por consiguiente, la respuesta alterada no parece depender, al menos en principio, de las propias condiciones del ensayo.

- S. ERILL: Quisiera preguntar si alguien ha realizado estudios de este tipo de células secretoras de IgA en condiciones de infección mucosa.
- B. CASANUEVA: Efectivamente, se han realizado estudios en otras muchas enfermedades. Nosotros seleccionamos precisamente un grupo de pacientes con infección respiratoria de vías altas, como modelo de infección en mucosas, debido a que este tipo de afectación se ha implicado como factor desencadenante, tanto de la púrpura de Schönlein-Henoch como de la nefropatía IgA.
- J. SEGOVIA: El Dr. Casanueva ha hablado de enfermedades que cursan a brotes. Mi pregunta se refiere a si en el curso de su investigación identificó algún parámetro experimental que pudiera alertar al clínico sobre un posible nuevo brote de estas enfermedades.
- B. CASANUEVA: Basándonos en nuestro estudio de seguimiento y aunque no podamos extraer conclusiones definitivas por lo limitado del número de casos, la determinación seriada del número de células circulantes secretoras de IgA podría predecir, en teoría, qué pacientes con púrpura de Schönlein-Henoch van a desarrollar afectación renal y cuáles no.
- J. SEGOVIA: Yo me refería no tan sólo a los aspectos pronósticos, sino también a si previamente al brote individual existiría algún hallazgo que permitiera predecirlo.
- B. CASANUEVA: No sabemos si inmediatamente antes de las manifestaciones clínicas de la púrpura de Schönlein-Henoch se encuentra ya un aumento en el número de células circulantes secretoras de IgA que pudiera predecir el inicio del brote o de la enfermedad. Es evidente que en el conjunto de la población general es muy difícil realizar este tipo de estudio. Sin embargo, se ha descrito en familiares de pacientes con púrpura de Schönlein-Henoch un mayor número de células circulantes con IgA en su membrana que tal vez suponga una predisposición genética a desarrollar el síndrome. No existen estudios sobre una posible mayor incidencia de la enfermedad en estos familiares. Tampoco hemos podido comprobar modificaciones previas en el número de células circulantes secretoras de IgA al brote de hematuria en la enfermedad de Berger. En dos casos estudiados durante el brote de hematuria y no presentados en nuestro trabajo, el número de células circulantes secretoras de IgA se encontraba extraordinariamente elevado con respecto a las cifras obtenidas en situación basal.

Desarrollo de un modelo animal para el síndrome de Lesch-Nyhan*

M. Casas

Laboratorio de Neuropsicofarmacología. Fundació d'Investigació de la Santa Creu i Sant Pau.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Etiopatogenia y sintomatología clínica del síndrome de Lesch-Nyhan

Michel Lesch y William Nyhan describieron por primera vez, en 1964, un trastorno congénito del metabolismo de las purinas, de aparente transmisión genética recesiva ligado al sexo, desencadenado por una disminución en la actividad de la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGPRT), que generaba un gran aumento en la síntesis de purinas, con el consiguiente exceso y acumulación de ácido úrico circulante y que se caracterizaba clínicamente por retraso mental, espasticidad, coreoatetosis, conducta automutilante, hiperuricemia, litiasis renal, nefropatía y artritis gotosa¹⁻⁵.

Han sido múltiples los trabajos que han aparecido en la literatura científica describiendo nuevos casos de pacientes, tratando de delimitar cada vez con mayor precisión la sintomatología sistémica y conductual característica de este síndrome y, principalmente, intentando profundizar en los procesos etiopatogénicos que lo desencadenan. La revisión de este conjunto de trabajos nos permite realizar un breve resumen de los conocimientos de que se dispone en la actualidad en relación a este trastorno.

Los casos estudiados de este síndrome son varones, aunque ha sido descrito excepcionalmente en mujeres⁶³. Los pacientes presentan una exploración neurológica normal durante los primeros meses de vida, observándose sólo aisladamente alteraciones en el tono muscular, siendo correcta la evolución psicomotriz. Entre el sexto y octavo mes comienza una regresión psicomotriz global, con pérdida de las adquisiciones y afectación progresiva del tono muscular, tendiendo hacia una franca hipertonia generalizada, que llega a impedir totalmente el inicio de la deambulacion. Aparece al mismo

tiempo irritabilidad continua y movimientos coreoatetósicos con afectación distónica de la musculatura laríngea y faríngea, lo cual genera disartria, disfagia grave e hiperemesis, asociadas a las consiguientes dificultades para la ingesta, agravada por la frecuente propensión a la aspiración alimentaria.

Unido a esta amplia semiología neurológica, los pacientes afectados del síndrome de Lesch-Nyhan presentan manifestaciones sistémicas, secundarias al aumento de ácido úrico circulante, totalmente superponibles a las que presentan los enfermos gotosos: hematuria, cristalluria, litiasis renal, anemia, artritis gotosa, etc.

Se considera que todos los pacientes presentan retraso mental, con un coeficiente intelectual (CI) igual o inferior a 50, aunque este dato queda un tanto dudoso en la literatura, ya que contrasta con el aspecto de alerta facial y las reacciones anímicas que en ellos puede observarse. Están descritos, sin embargo, casos aislados con coeficiente intelectual prácticamente normal⁴. Debe tenerse presente al medir el CI en estos pacientes la dificultad que entraña realizar en ellos un estudio psicométrico correcto, dada la distonía generalizada que padecen y la conducta autoagresiva que presentan cuando se les retiran las contenciones físicas que impiden su automutilación.

La manifestación clínica más llamativa de este síndrome es, sin duda, la conducta automutilante impulsiva que presentan los pacientes desde el inicio de la dentición. Esta conducta puede conllevar una pérdida de tejido alrededor de los labios y amputaciones parciales de los dedos realizadas con los dientes, así como autoagresiones efectuadas con diversos objetos a su alcance (cuchillos, objetos de decoración, etc.), todo ello asociado a una gran agresividad verbal. Sorprendentemente, al limitar la posibilidad de autoagresión con protecciones con guantes, vendajes, etc. el paciente adopta una conducta relajada y muestra un semblante feliz.

* Trabajo realizado gracias a la Ayuda de Investigación de la Fundación Bartolomé March del año 1986.

La enzima HGPRT convierte las bases purínicas hipoxantina y guanina en sus respectivos nucleótidos, ácidos iosínico y guanílico. En condiciones normales esta enzima está presente en todos los tejidos del organismo, aunque parece encontrarse en mayor cantidad en los ganglios basales. En los pacientes afectos del síndrome de Lesch-Nyhan, la actividad de esta enzima se ha demostrado disminuida en todos los tejidos, llegando a estar ausente en los ganglios basales^{8,9}. Recientemente, Lloyd et al¹⁰ realizaron determinaciones de neurotransmisores en el tejido cerebral de 3 pacientes fallecidos con dicha enfermedad, demostrando en todos ellos: a) actividad HGPRT muy disminuida; b) déficit global del funcionalismo del sistema dopaminérgico, con descenso en los niveles de dopamina, ácido homovanílico, dopadescarboxilasa y tirosina hidroxilasa en las regiones ricas en terminales dopaminérgicas (según estos autores ello indicaría una pérdida funcional del 65 al 90 % de las terminaciones dopaminérgicas mesolímbicas y nigroestriales), y c) niveles normales de dopamina en los cuerpos neuronales.

Mientras que el proceso fisiopatológico responsable de la sobreproducción de purinas y distribución de ácido úrico en los tejidos orgánicos en el síndrome de Lesch-Nyhan es bien conocido actualmente, la etiopatogénesis de los trastornos neurológicos y conductuales no está aclarada, y no puede ser explicada, como se creyó originariamente, por la acción tóxica directa de la hiperuricemia sobre el sistema nervioso central. Por ello, la presencia de estos trastornos supone en la actualidad uno de los interrogantes más importantes planteados en la investigación de este síndrome. Los escasos estudios realizados en autopsias de pacientes fallecidos con este trastorno no han aportado datos significativos más que la ya conocida deficiencia de la enzima HGPRT⁵, a excepción de los trabajos de Lloyd et al¹⁰ y otros, que describen un proceso de degeneración de las vías dopaminérgicas nigroestriales y una disminución de la presencia de aminoácidos esenciales en diversas regiones cerebrales, que podría redundar en una serie de alteraciones de los procesos de neurotransmisión centrales, especialmente ligados al sistema dopaminérgico.

Se han descrito casos de síndrome de Lesch-Nyhan con deficiencia completa de la enzima HGPRT y manifestaciones conductuales autoagresivas atenuadas¹¹, e incluso pacientes con este síndrome sin conducta automutilante^{12,13}, aunque es discutible el hecho de que se les

pueda etiquetar realmente con esta denominación al faltar esta sintomatología tan característica. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en algunos pacientes la conducta autoagresiva puede aparecer retrasada respecto del resto de manifestaciones somáticas, por lo que la observación de un caso sin automutilaciones no presupone que éstas no puedan aparecer en un estadio más avanzado de la enfermedad^{13,14}.

Parece ser que la conducta autoagresiva podría disminuir en su intensidad con la edad del paciente, si éste logra sobrevivir al conjunto de alteraciones sistémicas. Así, Mizuno describió en 1986 en un amplio grupo de pacientes la progresiva desaparición de esta conducta a partir de los 10 años.

En la actualidad el tratamiento de la abigarrada sintomatología que compone el síndrome de Lesch-Nyhan es, por desgracia, solamente de tipo sintomático. Por un lado se centra en disminuir los niveles plasmáticos de ácido úrico utilizando diversos tratamientos como el alopurinol^{2,15,16}, a pesar de la frecuente aparición de cálculos xantínicos en el riñón^{15,17-19}, la adenina asociada a alopurinol²⁰, la benzbromarona⁵, etc.; por otro, en controlar los devastadores efectos de la conducta autoagresiva a través de tratamientos basados en terapia comportamental²¹⁻²³, manipulación de diversos sistemas de neurotransmisión, entre los que destacan el dopaminérgico y el serotoninérgico²⁴, tratamientos psicofarmacológicos diversos²⁵ y principalmente con la aplicación de medidas protectoras como vendajes, férulas, guantes, etc., tendentes a evitar la automutilación²⁶⁻²⁸. No se descartan medidas quirúrgicas, principalmente estomatológicas, consistentes en extracciones dentarias^{26,29}, tendentes a imposibilitar que los pacientes puedan morderse.

Los resultados son, no obstante, extremadamente pobres, debido a la imposibilidad que tienen todos estos tratamientos de actuar a nivel etiopatogénico^{2,5,14}. Sin embargo, dado que el interés científico y clínico por este trastorno va aumentando en los últimos años, es de esperar que en un futuro próximo vayan siendo introducidos nuevos tratamientos más específicos, basados en los conocimientos fisiopatológicos que progresivamente vienen obteniéndose. Cabe destacar en este sentido los trabajos de Nyhan, primer científico en describir el síndrome, que ha estudiado recientemente la posibilidad de efectuar trasplantes de médula ósea en estos pacientes, con resultados aparentemente esperanzadores^{30,31}.

Al igual que en la mayoría de enfermedades que afectan al ser humano, se ha intentado desarrollar un modelo animal capaz de reproducir en lo posible la sintomatología clínica observada en el hombre, con el fin de disponer de un medio de investigación útil en el ensayo de nuevos enfoques terapéuticos. Han sido varias las modalidades utilizadas en el estudio del síndrome de Lesch-Nyhan, aunque el modelo animal actualmente más utilizado es la conducta automutilante inducida en la rata a través de la administración de altas dosis de cafeína durante un período de tiempo que oscila entre 10 y 15 días³². No está establecido cuál es el mecanismo por el que la cafeína genera esta conducta autoagresiva, habiéndose tratado de explicar, de forma poco satisfactoria, a través de los mecanismos de acción clásicamente aceptados para las metilxantinas, es decir, inhibición de la fosfodiesterasa, traslocación del calcio intra y extracelular y antagonismo adenosínico.

Dentro del proyecto de estudio de una posible actividad dopaminérgica de las metilxantinas que se desarrolla desde 1980 en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona³³⁻³⁸, se observó repetidamente que los animales que presentaban una hipersensibilización unilateral de los receptores dopaminérgicos estriatales después de la lesión de las vías nigroestriatales con 6-hidroxidopamina, presentaban, tras la administración de cafeína y teofilina, conductas autoagresivas con una mayor frecuencia e intensidad que las observadas en las ratas intactas. Así mismo, las dosis de xantina que se precisaban para la aparición de esta conducta autoagresiva eran mucho menores que las necesarias para desarrollar la misma conducta en el modelo animal del síndrome de Lesch-Nyhan utilizado comúnmente. Estas observaciones condujeron a iniciar un proyecto de investigación tendente a desarrollar un nuevo modelo animal para este síndrome, en el que utilizando metilxantinas, a través de la manipulación de las vías nigroestriatales del sistema de neurotransmisión dopaminérgico, se consiga obtener conductas autoagresivas de mayor intensidad y con una frecuencia de aparición más elevada que permitan mejorar el estudio de los diversos factores que determinan su aparición.

Justificación del objetivo propuesto

El modelo utilizado hasta la actualidad para el estudio de la conducta autoagresiva en el sín-

drome de Lesch-Nyhan se obtiene administrando altísimas dosis de cafeína (200-300 mg/día) por vía oral a ratas de la cepa Sprague-Dawley. Con este modelo se obtienen lesiones leves y moderadas en las patas delanteras y en la cola, entre el sexto y décimo día de la administración de cafeína, en un 10-20 % de animales.

Las elevadas dosis de cafeína, la baja frecuencia de aparición de autolesiones, su poca intensidad, el excesivo tiempo de latencia en su aparición y el absoluto desconocimiento de la causa que genera la conducta autoagresiva en estos animales intoxicados con cafeína hacen que este modelo animal haya seguido usándose, más por la circunstancia de ser el único existente que por su utilidad real.

Es conocido el hecho de que la utilización de la cafeína en este modelo animal surgió del intento de utilizar como substancia inductora de autolesiones algún derivado de las purinas, al ser la acumulación de estas bases el signo mensurable más característico del conjunto de trastornos que componen esta enfermedad. Sin embargo, la acumulación de purinas, si bien justifica la aparición de hiperuricemia, retraso mental, etc., no puede explicar de forma concluyente la aparición de autolesiones. Por ello, la mayoría de autores han estado hipotetizando respecto de la presencia de otros factores que, por sí solos, determinarían la aparición de conductas autoagresivas o activarían determinados mecanismos, hasta el momento desconocidos, que permitieran que una acumulación de bases púricas provocara estas conductas aberrantes.

Las observaciones de Ungerstedt et al³⁹, con hallazgo de autolesiones al administrar altas dosis de agonistas dopaminérgicos a ratas con denervación unilateral de las vías dopaminérgicas nigroestriatales, y por tanto con hipersensibilización de los receptores dopaminérgicos postsinápticos estriatales, de Lloyd et al¹⁰, al encontrar fenómenos completos de denervación bilateral de las vías dopaminérgicas nigroestriatales en pacientes fallecidos por este síndrome, y las del propio autor de este trabajo al constatar un significativo aumento en la frecuencia de aparición de las conductas autoagresivas y en la intensidad de las lesiones que éstas generaban, en ratas con denervación unilateral de la vía dopaminérgica nigroestriatal, al administrarles dosis moderadas de cafeína y teofilina, permitieron diseñar, en 1981, una hipótesis de trabajo que contemplaba la posibilidad de poner a punto un modelo animal del síndrome de Lesch-Nyhan mucho más efectivo, fiable y prác-

tico basado en la manipulación neuroquímica y farmacológica de las vías dopaminérgicas nigroestriatales.

Descripción cronológica del proceso de desarrollo del modelo animal del síndrome de Lesch-Nyhan

El desarrollo del modelo animal para el síndrome de Lesch-Nyhan que se expone en el presente trabajo no surgió de una hipótesis de técnica enunciada y programada de forma completa desde su inicio, sino que ha sido el producto de una continua y dinámica reflexión sobre los resultados obtenidos en las distintas fases de las investigaciones que se iban realizando en el laboratorio de Neuropsicofarmacología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, y las posibles direcciones a seguir en función de la progresiva incorporación al proyecto de los múltiples datos obtenidos en el desarrollo de los distintos experimentos que lo componen. En el curso de este análisis conceptual y metodológico constante es preciso reconocer que, en diversas ocasiones, el avance experimental ha sido facilitado por hallazgos obtenidos a través de un proceso de *serendipity*, lo cual al tiempo que ilustra sobre la complejidad del estudio realizado, realza la bondad de la metodología de investigación empleada.

El progresivo desarrollo conceptual de la hipótesis de trabajo, que ha conducido a las conclusiones que se dimanar de este proyecto, y que pueden concretarse en la propuesta de un modelo animal que es mucho más efectivo, sensible y eficaz para el síndrome de Lesch-Nyhan que el utilizado hasta la actualidad, ha sido elaborado a través de los hallazgos y reflexiones que se describen a continuación, ordenados por orden cronológico:

1979-1980

En los años 1979 y 1980, e. autor de este proyecto observó repetidamente, en la División de Neuropsicofarmacología del Instituto Karolinska de Estocolmo (Suecia), que los animales tratados con aminofiliina que se utilizaban en el estudio de una posible actividad dopaminérgica de las metilxantinas presentaban una elevada frecuencia de aparición de conductas automutilantes. Dado que Ungerstedt había descrito en 1971 la aparición de conductas autoagresivas en animales denervados en las vías nigroestriatales con 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) al admi-

nistrarles altas dosis de agonistas dopaminérgicos, se consideró la posibilidad de que las autolesiones inducidas por la aminofiliina fueran una prueba más, susceptible de ser estudiada, de la posible actividad dopaminérgica directa de las metilxantinas que se intentaba estudiar en aquellos momentos.

1980-1981

Se crea, en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, el Laboratorio de Neuropsicofarmacología Experimental y Clínica. Este laboratorio tiene como plan de trabajo inicial el estudio de los mecanismos básicos de la conducta rotadora inducida por agonistas dopaminérgicos en ratas con hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos estriatales y la delimitación de una posible actividad dopaminérgica directa de las metilxantinas.

En 1981, siguiendo el proyecto destinado a comprobar la posible actividad dopaminérgica de las xantinas, se iniciaron los estudios dosis/respuesta con cafeína, teofilina y teobromina utilizando el modelo animal de la rata rotadora, con el fin de delimitar las características de la respuesta rotatoria de los animales con receptores dopaminérgicos estriatales hipersensibilizados en función de la dosis de metilxantina administrada. Se observó que con cafeína y teofilina y a dosis de 30, 60, 90 y 120 mg/kg, aparecían entre un 20 % y un 30 % de animales con signos de autolesiones. No parecía existir una correlación entre la dosis de xantina administrada y el número de ratas lesionadas o la intensidad de la lesión, aunque sí existía entre la intensidad de la rotación y la aparición de lesiones. No se observaron conductas autoagresivas con la administración de teobromina a las dosis utilizadas (de 5 a 150 mg/kg), lo cual parecía confirmar, al ser muy pobre el paso de esta metilxantina a través de la barrera hematoencefálica, que la inducción de autolesiones por estas sustancias vendría mediatizada por un efecto sobre el sistema nervioso central.

En 1981 se publicó el trabajo de Lloyd et al¹⁰, en el que se relacionaban por primera vez los fenómenos de denervación de las vías dopaminérgicas nigroestriatales y el síndrome de Lesch-Nyhan, en pacientes afectados de este trastorno. Los datos de Lloyd et al sugerían que la relación entre automutilación y xantinas podía estar mediatizada por el sistema dopaminérgico.

Decidimos ese año iniciar una serie de estudios reglados de la relación existente entre administración de cafeína y teofilina, denervación

de las vías dopaminérgicas nigroestriatales y conductas automutilantes en ratas de la cepa Sprague-Dawley.

1981-1982

En una primera fase, y una vez reproducido el modelo animal clásico del síndrome de Lesch-Nyhan, se intentó estudiar el efecto de la cafeína en animales con las vías dopaminérgicas nigroestriatales bilateralmente denervadas con 6-OHDA, a fin de desarrollar fenómenos bilaterales de hipersensibilización de los receptores dopaminérgicos estriatales, tal como aparentemente se encontraban en los pacientes descritos por Lloyd et al. La exigencia de denervación completa evaluada a través del cuadro de afagia, adipsia y acinesia que se generaba en los animales bilateralmente denervados, hacía imposible, con la metodología disponible, poder recuperar a los animales e incluso mantenerlos vivos el período de 4-6 semanas que se consideraba adecuado para permitir el desarrollo de fenómenos completos de hipersensibilidad en los receptores dopaminérgicos estriatales. A pesar de que se observaron intensos fenómenos de automutilación en estos animales con dosis de cafeína de 5 y 15 mg/kg en la primera semana después de la denervación, la imposibilidad de efectuar una correcta evaluación conductual del grado de denervación, las presumibles diferencias interindividuales en el desarrollo del proceso de hipersensibilización de los receptores estriatales, el elevado número de muertes y la imposibilidad de lograr posteriormente la supervivencia del animal, aconsejaron abandonar este método de denervación bilateral, puesto que a pesar de tener un gran interés desde el punto de vista bioquímico, no lo tenía desde el punto de vista conductual.

Debe destacarse, sin embargo, el importante aporte teórico que estos estudios facilitarán al proyecto basado en la búsqueda de una actividad agonista dopaminérgica para las metilxantinas, dado que estas sustancias revertían completamente el modelo de adipsia, afagia y acinesia de forma parecida a como lo harían los agonistas dopaminérgicos directos, tales como la apomorfina o la bromocriptina.

1982-1983

Después de este primer estudio con ratas bilateralmente denervadas, todos los experimentos posteriores fueron realizados con animales unilateralmente denervados.

El primer estudio reglado con ratas unilateralmente denervadas, cumpliendo los requisitos de rotación en dos picos, indicador de denervación correcta³⁹, tuvo por objeto delimitar la incidencia de automutilaciones que presentaban estos animales en función de las dosis de cafeína y teofilina administradas (30, 60, 90 y 120 mg/kg por vía subcutánea durante 10 días), comparándolo con grupos control de animales no denervados. Los resultados mostraron que en las ratas no denervadas no aparecía ningún tipo de conducta automutilante, mientras que en los animales denervados, la incidencia de automutilaciones estaba situada entre el 20 % y el 30 %, sin que existiera, sin embargo, una correlación directa entre la dosis de metilxantina administrada y la incidencia o intensidad de las conductas autoagresivas.

1983-1984

Dado que los estudios realizados con el modelo animal de la rata rotadora indicaban que no todos los animales correctamente denervados y con rotaciones en dos picos presentaban una adecuada rotación con cafeína y teofilina, se decidió repetir los experimentos anteriores con ratas denervadas que presentaran rotación en dos picos con 0,05 mg/kg de apomorfina por vía subcutánea s.c. y rotaciones de más de 1.500 vueltas completas con 30 mg/kg de cafeína por vía subcutánea. Utilizando esta nueva metodología, la incidencia de automutilaciones aumentó al 40-50 % de los animales al administrar 60 y 90 mg/kg de cafeína. Aumentó, así mismo, el número de animales muertos con la dosis de 90 y 120 mg/kg, hasta el punto de que se desecharon totalmente estas dosis en la programación de los posteriores experimentos.

Hasta este momento los estudios sobre autolesiones se habían realizado controlando al mismo tiempo el tipo de patrón rotacional de los animales utilizados. Ello implicaba que los animales permanecían un mínimo de 12 horas en los rotómetros durante el período oscuridad, es decir, el período de máxima actividad. En 1981, al independizar el presente proyecto de búsqueda de un nuevo modelo animal para el síndrome de Lesch-Nyhan del estudio de una posible actividad dopaminérgica de las xantinas, los estudios centrados en la inducción de autolesiones empezaron a efectuarse en jaulas individuales. Sorprendentemente, a partir de este momento no se consiguió reproducir los resultados obtenidos anteriormente, siendo la fre-

cuencia e intensidad de las autolesiones muy variable y en todo caso siempre inferior al 40 % de los animales estudiados.

Indudablemente existía un factor diferencial entre la capacidad de inducción de autolesiones en las ratas situadas en los rotómetros, respecto de las situadas en cajas individuales. Se inició por ello un estudio sistemático para conseguir averiguar cuáles eran los factores diferenciales. Fueron valoradas y estudiadas las siguientes variables en animales unilateralmente denervados con 6-OHDA y que presentaban rotación en dos picos con apomorfina y rotación de más de 1.500 vueltas con 30 mg/kg de cafeína, administrando 60 mg/kg por vía subcutánea durante un período de 10 días:

1. Estancia en jaulas individuales durante todo el experimento *versus* estancia de 12 horas aisladas en los rotómetros y 12 en jaulas comunes. Los resultados fueron negativos, sin que hubiera correlación.
2. Realización de las inyecciones en el período de máxima actividad, es decir, en el período de 12 horas de oscuridad. Los resultados fueron negativos, es decir, no existía correlación.
3. Sujeción de un arnés apretado alrededor del cuerpo, en ratas inyectadas en sus jaulas, al igual que se efectuaba en los rotómetros. Los resultados fueron negativos, no existía correlación.
4. Abandono de los animales sin agua ni comida durante las 12 horas siguientes a la inyección de cafeína (inyección al inicio del período de luz). Los resultados seguían siendo muy variables, aunque aumentaron en la frecuencia de presentación. Por lo tanto, la falta de agua y comida, de forma similar a la deprivación a que estaban sometidas las ratas en los rotómetros, parecía aumentar la frecuencia de aparición de las autolesiones.
5. Para intentar diferenciar entre deprivación de bebida y deprivación de comida se controlaron las siguientes variables: a) animales con 24 horas de deprivación de bebida con posibilidad de comer *ad libitum*; b) ratas con 24 horas de deprivación de comida con posibilidad de beber *ad libitum*, y c) animales con 24 horas de deprivación completa de bebida y comida.

Los resultados mostraron que era la falta de ingesta de sólidos la que potenciaba la automutilación. Estos resultados podrían asimilarse al problema nutricional que presentan la mayoría de los pacientes que padecen este síndrome.

1984-1985

Con el fin de estandarizar y a ser posible acrecentar el efecto potenciador de los fenómenos de automutilación que tiene la deprivación de comida, se ensayó el proceso de adelgazar de forma progresiva a los animales hasta conseguir estabilizarlos en un 80 % de su peso corporal normal. Se pretendía con ello estandarizar el grado de deprivación que debían presentar los animales a fin de conseguir un modelo reproducible y consistente. Los resultados fueron concluyentes, dado que el número de animales que presentaban fenómenos de automutilación aumentó hasta un 70 %, aumentando así mismo la intensidad de las autolesiones.

En el transcurso del proceso descrito anteriormente y en el proyecto paralelo que sobre el estudio de una posible actividad dopaminérgica de las metilxantinas se venía desarrollando en nuestro laboratorio, se habían observado unos intensos fenómenos de tolerancia en la conducta rotatoria inducida por estas sustancias cuando eran administradas en intervalos de 24 horas. Posteriormente, nuestro grupo de trabajo consiguió inhibir este proceso de tolerancia administrando un pretratamiento con el anticolinérgico de acción central escopolamina, siendo inefectiva la metilescopolamina, anticolinérgico que no pasa la barrera hematoencefálica.

Con el fin de averiguar si estos fenómenos de tolerancia observados en la actividad dopaminérgica de las metilxantinas podían interferir en la aparición de las conductas autoagresivas de los animales que estudiábamos, se administraron diferentes dosis de escopolamina y metilescopolamina asociadas a la cafeína y teofilina.

Los resultados fueron altamente satisfactorios, obteniéndose autolesiones en el 100 % de animales con la administración de 60 mg/kg de cafeína y 20 mg/kg de escopolamina. La dosis de 90 mg/kg de cafeína fue desechada porque aunque se obtenían el 100 % de animales automutilados, mataba a un 70-90 % de ellos en los tres primeros días de estudio.

Con el fin de evitar en lo posible los efectos periféricos de la escopolamina se añadió el anticolinérgico de acción periférica neostigmina a la dosis de 0,4 mg/kg. Con ello mejoró enormemente la sintomatología periférica de bloqueo atropínico.

1985-1986

Tomando como modelo ideal la administración a ratas deprivadas hasta un adelgazamiento

to del 20 % de su peso corporal, de escopolamina, 20 mg/kg, más neostigmina, 0,4 mg/kg, más cafeína 60, mg/kg, o bien teofilina, 60 mg/kg, el siguiente paso fue intentar bloquear la conducta automutilante con haloperidol. Los resultados fueron altamente sorprendentes, al obtener con dosis de haloperidol de 0,5, 1,5 y 3 mg/kg un aumento en la intensidad de las autolesiones, siendo este fenómeno más evidente con las dosis de 1,5 mg/kg. Para lograr la supresión de la conducta autoagresiva, el animal debe quedar cataleptizado, cosa que sucede con la dosis de 5 mg/kg. Esta dosis, extraordinariamente alta comparada con la dosis que se precisa para inducir catalepsia en una rata intacta (0,5 mg/día), puede ser explicada a través del efecto dopaminérgico de las xantinas.

Dado que el haloperidol es un neuroléptico con efecto bloqueador predominante sobre los receptores D_2 , aunque también provisto de efecto bloqueador D_1 , se repitió el resultado con dos neurolépticos bloqueadores específicos de los receptores D_1 y D_2 . Se escogió el neuroléptico SCH-23390 para los receptores D_1 (0,1, 0,25, 0,5 y 1 mg/kg por vía subcutánea) y el sulpiride para los receptores D_2 (0,25, 0,5, 1 y 5 mg/kg por vía subcutánea). Los resultados fueron concluyentes: el neuroléptico SCH-23390 bloqueaba perfectamente las autolesiones a la dosis de 0,5 mg/kg; por el contrario, el sulpiride potenciaba estas autolesiones a la dosis de 1 mg/kg.

Conclusión

Los estudios antes expuestos permiten proponer un nuevo modelo animal para el síndrome de Lesch-Nyhan que consiste en la administración de cafeína o teofilina a dosis de 60 mg/kg por vía subcutánea a ratas Sprague-Dawley con denervación unilateral de las vías dopaminérgicas nigroestriales con 6-OHDA, disminución de un 20 % de su peso corporal, inhibición de las vías colinérgicas centrales con escopolamina 20 mg/kg y bloqueo selectivo de los receptores dopaminérgicos D_2 con sulpiride 5 mg/kg.

Con la estandarización conductual del modelo, se ha considerado terminada esta primera fase de estudio experimental, que deberá ser seguida por otra que reproduzca los hallazgos obtenidos, estudiando los cambios moleculares que existen en el cuerpo estudiado. Ello se realizará a través de la implantación de cánulas en cuerpo estriado y el posterior análisis *in vivo* de los neurotransmisores y sustancias activas implicados en el proceso de autolesiones. De una

progresiva delimitación de los factores que intervienen en el desarrollo de las autolesiones en el modelo animal descrito en este trabajo se podrán, con toda seguridad, inferir nuevas aproximaciones terapéuticas que contribuyan a un tratamiento más efectivo de la conducta automutilante de los pacientes afectados del síndrome de Lesch-Nyhan.

BIBLIOGRAFÍA

1. LESCH M, NYHAN WL. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med*, 1964; 61-70.
2. NYHAN WL. The Lesch-Nyhan syndrome. *Ann Rev Med* 1973; 41-60.
3. SCUYLEY C. Orofacial manifestations of the Lesch-Nyhan syndrome. *Int J Oral Surg* 1981; 10: 380-383.
4. CHRISTIE R, BAY C, KAUFMAN IA, BAKAY B, BORDEN M, NYHAN WL. Lesch-Nyhan disease: clinical experience with nineteen patients. *Dev Med Child Neurol* 1982; 24: 293-306.
5. MIZUNO T, ENDOH H, KONHISHI Y, MIYACHI Y, AKOAKA I. An autopsy case of the Lesch-Nyhan syndrome: normal HGPRT activity in liver and xanthine calculi in various tissues. *Neuropaediatric* 1986; 3: 351-355.
6. HARA K, KASHIWAMATA S, OGASAWARA N et al. A female case of the Leach, Nyhan syndrome. *Tohoku J Exp Med* 1982; 137: 275-282.
7. OGASAWARA N, KAASHIWAMATA S, OISHI H et al. Hypoxanthine, guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) deficiency in a girl. *Adv Exp Med Biol* 1984; 165: 13-18.
8. KOPIN IJ. Neurotransmitters and the Lesch-Nyhan syndrome. *N Engl J Med* 1981; 5: 1.148-1.149.
9. BAUMEISTER AA, FRYE GD. The biochemical basis of the behavioral disorder in the Lesch-Nyhan syndrome. *Neurosci Biobehav Rev* 1985; 9: 169-178.
10. LLOYD KG, HORNKYIEWICZ O, DAVIDSON L et al. Biochemical evidence of dysfunction of brain neurotransmitters in the Lesch-Nyhan syndrome. *N Engl J Med* 1981; 11: 6-1.111.
11. FATTAL A, SPIRER Z, ZOREF SHANI E, SPERLING O. Lesch-Nyhan syndrome: biochemical characterization of case with attenuated behavioral manifestation. *Enzyme* 1984; 31: 55-60.
12. BAKAY B, NISSINEN E, SWEETMAN L, FRANCKE U, NYHAN WL. Utilization of purines by an HPRT variant in an intelligent, nonmutative patient with features of the Lech-Nyhan syndrome. *Pediatr Res* 1979; 13: 1.365-1.370.
13. MITCHELL G, McLONNES RR. Differential diagnosis of cerebral palsy: Lesch-Nyhan syndrome without self-mutilation. *Can Med Assoc* 1984; 130: 1.323-1.324.
14. SINGH S, WILLERS I, ULLRICH K, GUSTMANN H, NIEDERWIESER A, GOEDDE HW. A case of Lesch-Nyhan

- syndrome with delayed onset of self-mutilation search for abnormal biochemical, immunological and cell growth characteristic in fibroblasts and neurotransmitters in urine. *Adv Exp Med Biol* 1986; 195: 205-210.
15. OGAWA A, WATANABE K, MINEJIMA N. Renal xanthine stone in Lesch-Nyhan syndrome treated with allopurinol. *Urology* 1985; 26: 56-58.
 16. EDWARDS NL, PUIG JG, MATEOS FA. The effect of allopurinol on cerebral spinal fluid (CSF) purines in hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase (HGPRT) deficiency syndromes. *Adv Esp Med Biol* 1986; 195: 465-469.
 17. MORTON WJ. Lesch-Nyhan syndrome. *Urology* 1982; 20: 506-509.
 18. LORIS PABLO C, OLIVAN DEL CACHO MJ, HERAS GIRONELLA M et al. A: Xanthine lithiasis in a case of Lesch-Nyhan syndrome treated with allopurinol. *An Esp Pediatr* 1983; 19: 401-404.
 19. OKA T, UTSUNOMIYA M, INCHIKAWA Y et al. Xanthine calculi in the patient with the Lesch-Nyhan syndrome associated with urinary tract infection. *Urol Int* 1985; 40: 138-140.
 20. BUHRDEL P, KRUGER W, HIRSCHBERG K, WEHNERT M. Adenine therapy in Lesch-Nyhan syndrome. *Acta Pediatr Hung* 1985; 26: 327-333.
 21. JONES FH. An extinction procedure for eliminating self-destructive behavior in a 9-year-old autistic girl. *J Autism Child Schizo* 1974; 4: 241-250.
 22. GILBERT S, SPELLACY E, WATTS RW. Problems in the behavioural treatment of self-injury in the Lesch-Nyhan syndrome. *Dev Med Child Neurol* 1979; 21: 795-800.
 23. LA VECCHIO F. Behavioural treatment of Lesch, Nyhan Syndrome. *Dev Med Child Neurol* 1980; 22: 405-407.
 24. NYHAN WL, JOHNSON HG, KAUFMAN IA, JONES KL. Serotonergic approaches to the modification of behavior in the Lesch-Nyhan Syndrome. *Appl Res Ment Retard* 1980; 1: 25-40.
 25. DASHEIFF RM. Benzodiazepine treatment for Lesch-Nyhan syndrome. *Dev Med Child Neurol* 1980; 22: 101-102.
 26. FERRANDEZ A, MAYAYO E, NYHAN L, BAKAY B. Report of a patient with Lesch-Nyhan Syndrome by total deficiency of HGPRT and with normal activity in female family members. *An Esp Pediatr* 1982; 17: 60-64.
 27. WURTELE SK, KING AC, DRABMAN RS. Treatment package to reduce SIB in a Lesch-Nyhan patient. *J Ment Defic Res* 1984; 28: 227-234.
 28. SHAPIRA J, ZILBERMAN Y, BECKER A. Lesch-Nyhan syndrome: a nonextracting approach to prevent mutilation. *Spec Care Dentist* 1985; 5: 210-212.
 29. LABANC J, EPKERE BNJ. Lesch-Nyhan syndrome: surgical treatment in a case with lip chewing. A case report. *J Maxillofac Surg* 1981; 9: 64-67.
 30. NYHAN WL, PAGE T, GRUBER HE, PARKMAN R. Bone marrow transplantation in Lesch-Nyhan disease. *Birth Defects* 1986; 22: 113-117.
 31. NYHAN WL, PARKMAN R, PAGE T et al. Bone marrow transplantation Lesch-Nyhan disease. *Adv Exp Med Biol* 1986; 195: 167-170.
 32. FERRER I, COSTELL M, GRISOLIA S. Lesch-Nyhan syndrome-like behavior in rats from caffeine ingestion. *FEBS Lett* 1982; 141: 275-278.
 33. CASAS M, PRIETO R, BERNAT M et al. Rotational behaviour induced by theophylline in 6-OHDA nigrostriatal denervated rats is dependent of the supersensitivity of the denervated dopaminergic receptors, but is not correlated with the apomorphine-induced contralateral rotation. *Neurosci Lett* 1983; supl: 14-S56.
 34. CASAS M, ÁLVAREZ E, UDINA C et al. The supersensitivity of the striatal dopamine receptors enhance the self-mutilative behaviour induced by methylxanthines. 14th Collegium Internationale Neuro Psychopharmacologium Congress. Florencia, 19-23 de junio de 1984.
 35. CASAS M, ÁLVAREZ E, GARCIA C, JANE F, HERRERA-MARSCHITZ M, UNGERSTEDT U. Ergot alkaloids and methylxanthines but not apomorphine, restore the drinking behaviour in bilateral 6-OHDA nigrostriatal denervated rats. 14th Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologium Congress. Florencia, 19-23 de junio de 1984.
 36. CASAS M, ÁLVAREZ E, UDINA C, GRAU JM, JANE F, HERRERA-MAHY N. Methylxanthines potentiate the dopaminergic activity of low doses of bromocriptine in the «Turning behaviour» animal model. *Cajal Conference in Neurobiology*. Madrid, 17-20 de noviembre de 1984.
 37. CASAS M, ÁLVAREZ E, TALARN A, UDINA C, HERRERA-MARSCHITZ M, UNGERSTEDT U. Scopolamine may prevent but not reverse the tachyphylactic phenomena induced by daily caffeine administration in the «turning behaviour» animal model. *Neurosci Lett* 1984; supl.: 18-S222.
 38. CASAS M, SALVA P, ÁLVAREZ E et al. Enhancement of aminophylline toxicity in female 6-OHDA nigrostriatal denervated rats. IUPHAR. 9th International Congress of Pharmacology. Londres, 29 julio -3 agosto de 1984.
 39. UNGERSTEDT U, HERRERA-MARSCHITZ M. Behavioural pharmacology of dopamine receptor mechanisms. En: Stjärne L, Hedwist P, Lagerkrantz H, Wenmalm A, eds *Chemical neurotransmission: 75 years*. Nueva York, Academic Press, 1981; 481-494.

DISCUSIÓN

J.E. FELIU: ¿Tiene usted alguna evidencia de que todos estos tratamientos a los que se someten los animales tengan algún efecto sobre los niveles de la enzima hipoxantina-guanina-

fosforribosil-transferasa?

M. CASAS: No disponemos de los medios necesarios, pero en Valencia está el grupo del Prof. Santiago Grisolia, que trabaja intensamente

sobre cafeína y niveles de metilxantinas a nivel central y sus efectos sobre esta enzima.

J.E. FELIU: Es decir, que todo este tratamiento no afecta en ningún momento a la expresión o a la actividad de la enzima que en principio es causa de la enfermedad.

M. CASAS: En principio no. Además, otros autores están consiguiendo esas autolesiones administrando dosis altas de apomorfina.

J.E. FELIU: ¿Y cuál es su interpretación de la necesidad del ayuno? ¿Cree usted que esto podría explicarse por la situación hormonal que acompaña al ayuno, o quizá por el estrés añadido?

M. CASAS: Pienso que puede tratarse de algún problema metabólico relacionado con el ayuno. En cualquier caso, los pacientes con síndrome de Lesch-Nyhan siempre presentan desnutrición.

Otro aspecto a destacar es el condicionamiento de los estímulos ambientales mediados por la activación del sistema dopaminérgico. Por poner un ejemplo, tuvimos unas ratas a las que habíamos inducido autolesiones, almacenadas durante 6 meses pendientes de envío y como no las enviamos las volvimos a colocar casualmente en el mismo lugar

en que se habían automutilado. Con gran sorpresa constatamos que volvieron a automutilarse, aunque con menor intensidad. Es decir, sin fármaco, por estimulación del sistema dopaminérgico y por haber aprendido una serie de conductas, las ratas eran capaces de repetir la conducta automutilante en respuesta al medio ambiente. Eso complica mucho más las cosas, porque los niños con síndrome de Lesch-Nyhan tienen un problema enzimático, naturalmente, pero al mismo tiempo presentan una desafrentización de las vías dopaminérgicas estriatales, y se autolesionan en el mismo ambiente, es decir, que los fenómenos de automutilación en estos pacientes son realmente más complejos de lo que en un principio podría parecer.

S. ERILL: Quería preguntar al Dr. Casas en relación con los animales en los que se consigue un 75 % de autolesiones en este modelo, en los que no se ha empleado escopolamina sino exclusivamente denervación, ¿qué piensa que podría suceder si se administrara fisostigmina, es decir, un fármaco con efectos colinérgicos?

M. CASAS: Pues no lo sé, pero esta interesante cuestión está incluida en la memoria de investigación de los próximos años.

Automatismo cardíaco normal y anormal

J. Cosín, A. Hernández, T. Caffarena, F. Andrés y B. Graullera

Centro de Investigación. Hospital La Fe. Valencia.

No existe un criterio único, ni tan siquiera un grupo de criterios que aplicados a una determinada manifestación de automatismo cardíaco permitan discernir si estamos ante un mecanismo de automatismo normal o anormal.

Consideramos que la propiedad del automatismo cardíaco reside en el nódulo sinusal, el cual es el marcapasos primario del corazón. Sin embargo, en aquellas condiciones en las que la activación del nódulo sinusal no puede alcanzar a aurículas y/o ventrículos, otros automatismos subsidiarios de reserva pueden mantener la vida del individuo y deben considerarse normales.

En electrofisiología celular se identifica la despolarización diastólica por fase 4 secundaria al decaimiento de la corriente de extrusión del potasio (I_{K2}) como el sustrato iónico normal de la actividad marcapasos². Sin embargo, los automatismos que la destrucción del nódulo sinusal libera en las aurículas se producen probablemente por la cooperación entre automatismos por fase 4 y automatismos dependientes de pospotenciales, la llamada actividad evocada.

En electrofisiología cardíaca experimental y clínica juzgamos la normalidad o anormalidad de un automatismo según la longitud de los ciclos de descarga que produce, según la respuesta a la estimulación eléctrica en diversas modalidades, según la sensibilidad que muestra al sistema nervioso vegetativo y según los efectos que causan los diferentes fármacos cardioactivos. Sin embargo, los diversos tipos de automatismo cardíaco que hemos señalado tienen diferentes modos de comportamiento electrofisiológico normal.

Finalmente el clínico cualifica un automatismo cardíaco como normal cuando su funcionamiento no origina signos o síntomas de disfunción o arritmia.

Automatismo cardíaco supone generar impulsos que se transmitan al resto del corazón, den-

tro del rango de frecuencias biológicamente útil para cada situación. Un automatismo anormal puede serlo por generar ciclos excesivamente largos, es lo que ocurre con un automatismo sinusal disfuncionante (enfermedad del seno) y con automatismos subsidiarios disfuncionantes o inadecuados. En el punto opuesto, un automatismo puede generar síntomas si sus ciclos son muy cortos (taquicardias) bien por automatismos por fase 4 acelerados, bien por actividad evocada.

Habitualmente el clínico está interesado en saber sobre la normalidad de un automatismo para tomar una decisión terapéutica bien de supresión (fármacos, ablación, cirugía) o bien de substitución (marcapasos implantable). Pero la adquisición de conocimientos sobre el normal funcionamiento de los diversos automatismos que pueden aparecer en un corazón puede ser útil además para la mejor interpretación del comportamiento eléctrico del corazón en las diferentes situaciones. Así mismo la definición de algunas características de la enfermedad de los marcapasos puede resultar un marcador que permita entrever la extensión y evolución de las lesiones cardíacas.

Métodos

Con mucha frecuencia y en el contexto de las arritmias este tema se desarrolla haciendo referencia a la importancia y características de la actividad evocada en la génesis de las taquicardias. Desde un punto de vista que queremos que sea más amplio, vamos a describir las características de los automatismos cardíacos subsidiarios auriculares y ventriculares para poder tener una idea sobre su normalidad electrofisiológica y sobre su papel en la enfermedad del nódulo sinusal, en el bloqueo auriculoventricular. Para ello, nos vamos a basar en diversas series clínicas y experimentales desarrolladas en la Unidad de Investigación del Hospital La Fe y en colaboración con los Servicios de Cardiología Clínica del mismo hospital.

TABLA I
RESPUESTA DEL AUTOMATISMO SUBSIDIARIO AURICULAR A LA SOBREESTIMULACIÓN

	Primera pausa (TRA)			Pausas secundarias	
	Duración (% CB)	Origen (frecuencia de estimulación (180-300 latidos/min))	Incidencia	Duración (% TRA)	Frecuencia de estimulación (180-300 latidos/min)
Ritmo sinusal	↑ (116 %)	AD Frecuencias altas bloqueo de entrada	∅	∅	∅
Ritmo subsidiario	↓ (90 %)	AD o AI†	∅ (160 %)	(200 %)	Número ↑ Duración ↑ Precocidad ↑

CB: ciclo básico; AD: aurícula derecha; AI: aurícula izquierda; TRA: tiempo de recuperación del marcapasos auricular; ∅: no se produce el fenómeno descrito para la otra situación.

Resultados

Automatismo auricular extrasinusal

Aparición experimental del ritmo auricular: La escisión quirúrgica del nódulo sinusal en las preparaciones de corazón aislado de cobayo produjo la aparición de un ritmo de escape de la unión auriculoventricular de modo inmediato en 2/3 partes de los experimentos. Menos frecuente fue el establecimiento de un ritmo originado en las aurículas. Después de un período de tiempo variable, normalmente menor de 15 min,

el ritmo de la unión es progresivamente substituido por un ritmo auricular relativamente estable, con frecuentes pausas que dan origen a escapes de la unión o de otros focos auriculares⁴. Este comportamiento se da igual en perros a los que se les destruye el seno por otros métodos^{5,6}.

El origen del ritmo auricular puede variar de un experimento a otro e incluso dentro de la misma experiencia^{5,8}. Se ha señalado como punto de origen más frecuente la unión entre la vena cava y la aurícula derecha, y sobre todo a lo largo del surco terminal^{5,7}.

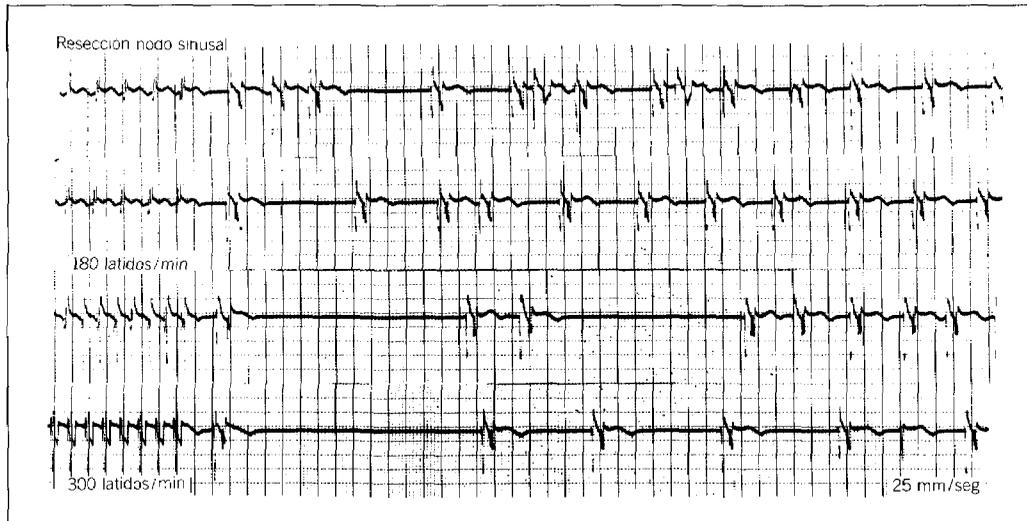


Fig. 1. Sobreestimulación auricular de un corazón aislado de cobayo sin nódulo sinusal a dos frecuencias (180 y 300 latidos/min). Al incrementar la frecuencia de estimulación las pausas secundarias se incrementan en número y duración. Para la misma frecuencia de estimulación tanto el primer escape como las pausas secundarias tienen una duración similar.

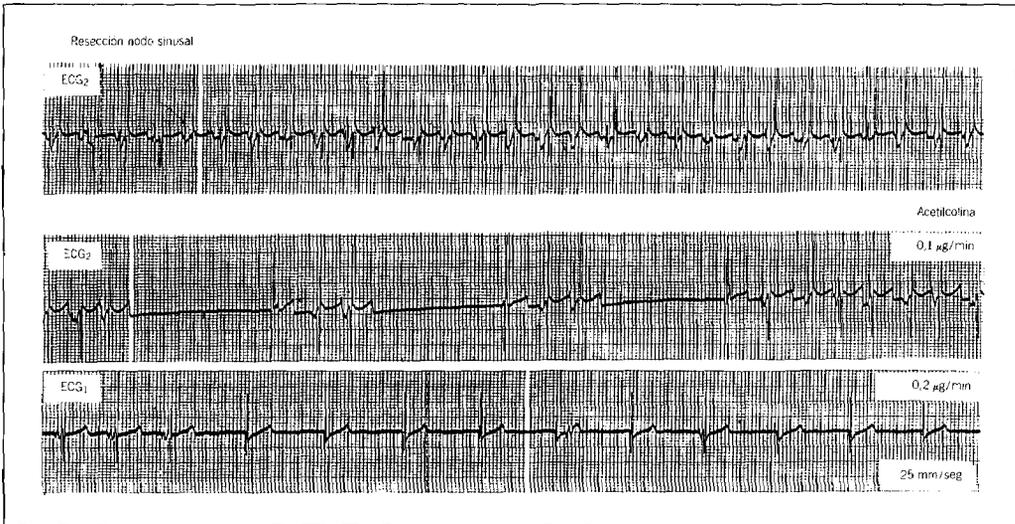


Fig. 2. Efecto de la perfusión de acetilcolina sobre el ritmo auricular en un corazón aislado de cobayo sin nódulo sinusal. La primera tira muestra las características del ritmo auricular subsidiario. La segunda tira muestra la aparición de frecuentes pausas secundarias creadas por un escape nodal (efecto acetilcolina). La tercera tira (a más dosis) muestra la desaparición del ritmo auricular y su sustitución por un ritmo nodal de escape, menos sensible a los efectos de la acetilcolina.

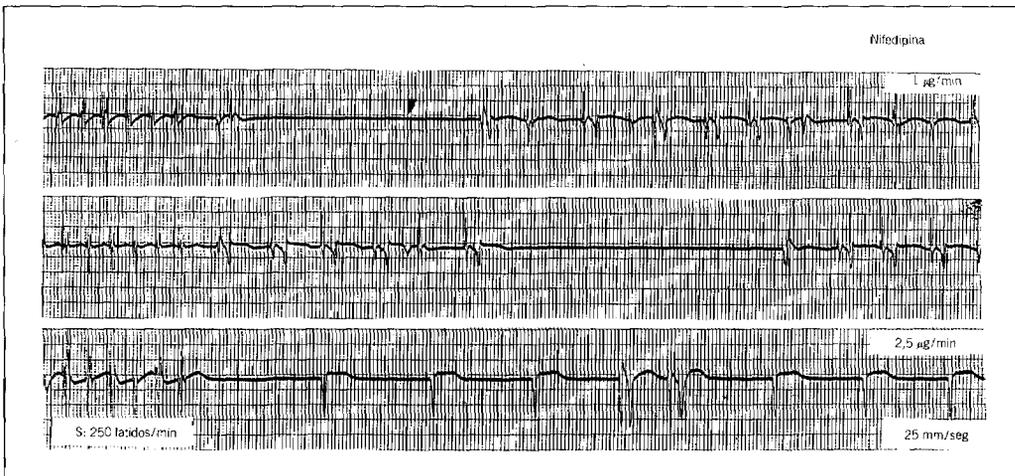


Fig. 3. Efecto de la nifedipina sobre el ritmo auricular en corazón aislado de cobayo, tras la sobreestimulación (s) auricular a 250 latidos/min. Las dosis altas (2,5 mg/min) deprimen el ritmo auricular hasta casi suprimirlo y estimulan un ritmo de la unión auriculoventricular, produciendo la sustitución de uno por otro y desapareciendo paradójicamente las pausas secundarias.

Características electrofisiológicas del automatismo auricular. La onda P del ritmo auricular extrasinusal tiene aspecto sinusal, es diferente de la sinusal previa, con cambios espontáneos en su morfología. El intervalo PR es igual o inferior

que el sinusal, los intervalos P-P son variables. La frecuencia auricular es ligeramente inferior (22 %) a la sinusal previa. En realidad el ritmo auricular aparece en cortos períodos de una duración de alrededor de 15 seg que terminan en

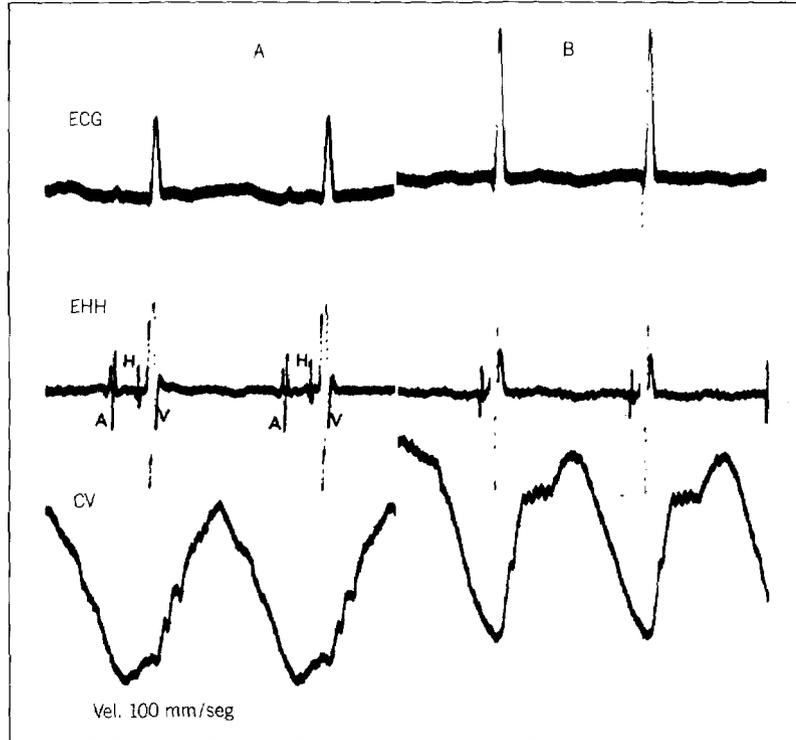


Fig. 6. A: electrocardiograma (ECG) y electrograma del haz de His (H en EHH) de un corazón aislado de cobayo. B: idénticos registros tras la supresión de ambas aurículas. El ritmo considerado se origina en el haz de His dando lugar a un H-V ligeramente más corto que en A.

metros de estimulación y el TRA. b) Pausas secundarias: en el 60 % de las experiencias tras el TRA se producen pausas secundarias superiores al doble del TRA (tabla I). Suelen aparecer antes del latido 15. Tras las pausas se producen escapes auriculares o de la unión auriculoventricular (fig. 1). Son en cierto modo repetibles las características de las pausas secundarias para similares parámetros de estimulación y en la misma experiencia. El incremento de la frecuencia de estimulación hace que aparezcan pausas secundarias si previamente no se produjeron o que éstas sean más duraderas, más frecuentes y/o más precoces (fig. 1).

Respuesta a otros modos de estimulación. Los ritmos auriculares (RA) son muy sensibles a la estimulación a latido único¹⁰. Esto explicaría el fenómeno de *underdrive suppression* que muestran los RA de las preparaciones de corazón aislado, los cuales pueden ser suprimidos mediante estimulación eléctrica a frecuencias inferiores a la suya sin mostrar competencia con el ritmo de estimulación.

Respuesta a los mediadores neurovegetativos. En nuestra experiencia el isoproterenol aceleró los ritmos auriculares, redujo la duración del TRA, y descendió la incidencia y duración de las pausas secundarias y de escapes de la unión auriculoventricular. Por contra, la acetilcolina descendió la frecuencia del RA e incrementó la incidencia hasta el 100 % de las pausas secundarias y también su duración. El RA se mostró más sensible a la acetilcolina que el RS y que los ritmos de la unión auriculoventricular (fig. 2)^{4,9}.

Respuesta a fármacos. Todos los fármacos antiarrítmicos que hemos utilizado deprimen los ritmos auriculares, sobre todo los antagonistas del calcio, la amiodarona y los bloqueadores beta. La depresión se hace evidente por la prolongación del intervalo P-P del RA, la aparición más frecuente de pausas secundarias, más prolongadas, y la mayor sensibilidad a la sobreestimulación. Los antagonistas del calcio, que producen estimulación de los automatismos de la unión auriculoventricular, consiguen substituir el ritmo auricular por el ritmo de la unión (fig. 3)⁴.

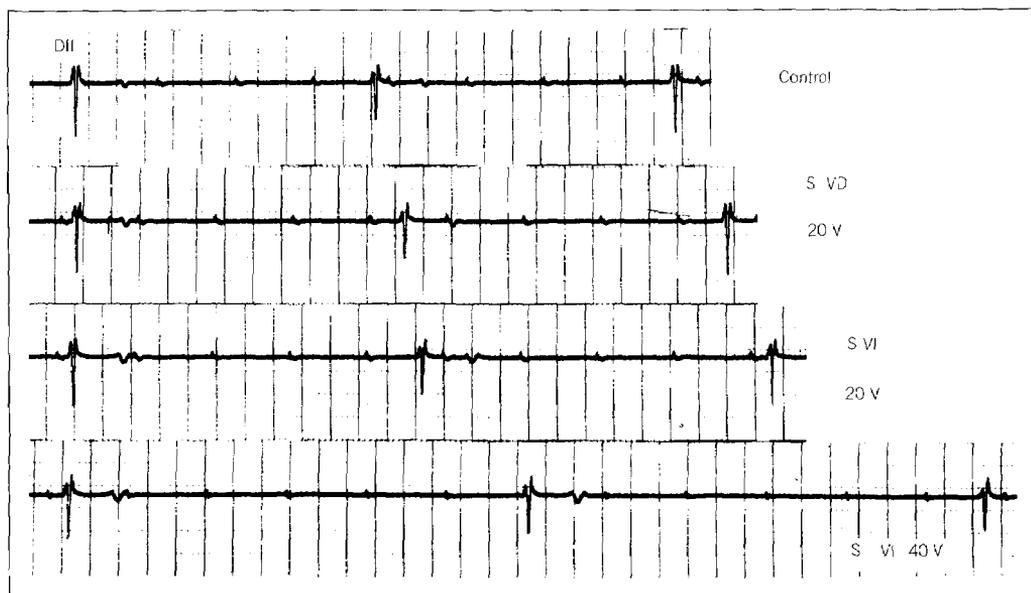


Fig. 7. Efecto de la estimulación eléctrica (s) del vago cervical derecho (VD) e izquierdo (VI) a 20 y a 40 voltios en un perro al que se le ha producido un bloqueo auriculoventricular completo. Observese cómo se produce una bradicardia del ritmo ventricular de escape que depende del vago estimulado y de las características de la estimulación.

Electrofisiología celular del automatismo subsidiario auricular. Diversos trabajos coinciden en admitir la presencia de dos mecanismos electrofisiológicos celulares como sustrato del automatismo auricular autosostenido: despolarización diastólica por fase 4 y pospotenciales (actividad evocada)^{3,11}. Ambos mecanismos se complementan en su finalidad de mantener ritmos autosostenidos. En fibras auriculares se ha descrito la presencia espontánea de dos tipos de pospotenciales: precoces y tardíos, estos últimos situados a lo largo de la *crista terminalis*^{3,11}.

Automatismo auricular y taquicardia auricular lenta. En un estudio realizado en 32 pacientes con enfermedad del nódulo sinusal¹², el 19 % presentaban frecuentes períodos de ritmos auriculares con una frecuencia, oscilando entre 50 y 110 latidos/min, con ondas P diferentes a las que considerábamos como sinusales, de morfología frecuentemente cambiante, con intervalos P-P variables, que aparecían como ritmos de escape y que se mantenían por períodos cortos para terminar en un escape nodal o auricular de otro origen. Éstos ritmos los denominamos taquicardias auriculares lentas y sugerimos que pudieran ser automatismos subsidiarios (fig. 4).

Otros autores¹³ también han identificado estos ritmos con el automatismo subsidiario auricular, que en tal caso serían automatismos fisiopatológicamente «normales» y a los que para su correcta interpretación y tratamiento se les podrían aplicar los conocimientos experimentales adquiridos.

Automatismo subsidiario de la unión auriculoventricular

Tipos de automatismo. Experimentalmente, desde el punto de vista electrofisiológico podemos diferenciar varios tipos de automatismos:

1. Los nodohisianos¹⁴: AVJ₁, que se pone en evidencia inyectando prostigmina en la arteria sinusal y que debe corresponder al que normalmente se escapa en las lesiones sinusales, y el AVJ₂, inyectando prostigmina en la arteria del nodo y que debe ser el que incrementa mucho su frecuencia por la estimulación de estructuras simpáticas (podrían corresponder a algunos ritmos de escape de los bloqueos suprahisianos) (fig. 5).

2. Los hisianos, que hemos puesto en evidencia mediante la resección de ambas aurículas

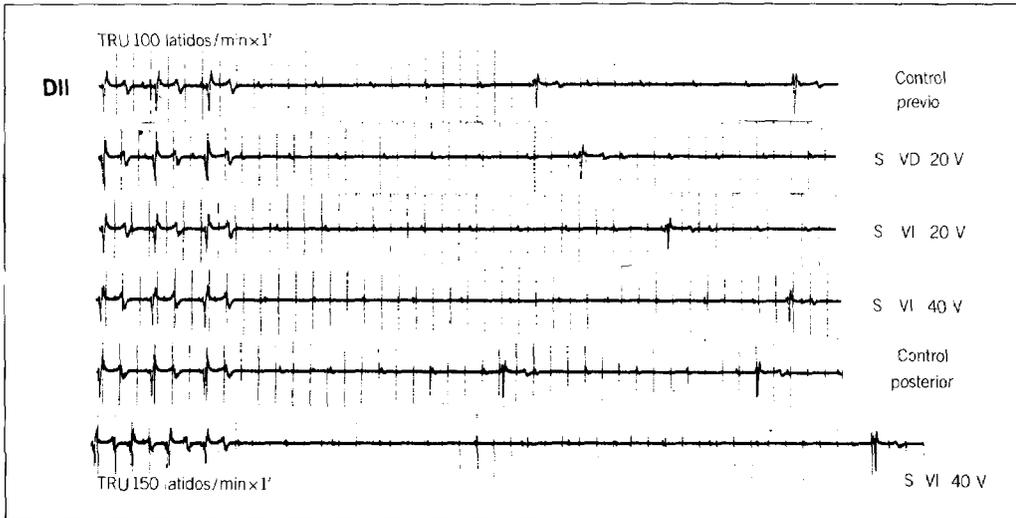


Fig. 8. Similar preparación que en la figura 7. El tiempo de recuperación de la unión auriculoventricular se incrementa con la estimulación simultánea del vago cervical y al incrementar las frecuencias de estimulación ventricular.

en las preparaciones de corazón aislado de cobayo y que presentan una morfología y duración del QRS iguales a las previas a la resección, con un intervalo H-V ligeramente inferior al del ritmo sinusal ($19 \pm 2/20 \pm 1$ mseg) (fig. 6)¹⁵.

3. Los infrahisianos, que han aparecido cuando hemos desconectado aurículas de ventrículos en perros por la destrucción de las estructuras nodohisianas mediante inyección de formaldehído o ablación eléctrica. Estos tienen un complejo QRS ancho ($84 \pm 19/52 \pm 2$ mseg en RS) y aberrado, una frecuencia de escape lenta ($39 \pm 10/115 \pm 24$ latidos/min en RS) y no iban precedidos de electrograma del haz de His. Estos últimos ritmos, los hisianos e infrahisianos, pueden corresponder con los que escapan en las situaciones clínicas de bloqueo intrahisiano e infrahisiano¹⁵.

Los resultados experimentales los contrastamos con series clínicas de pacientes afectados de enfermedad del seno o bloqueo auriculoventricular crónico.

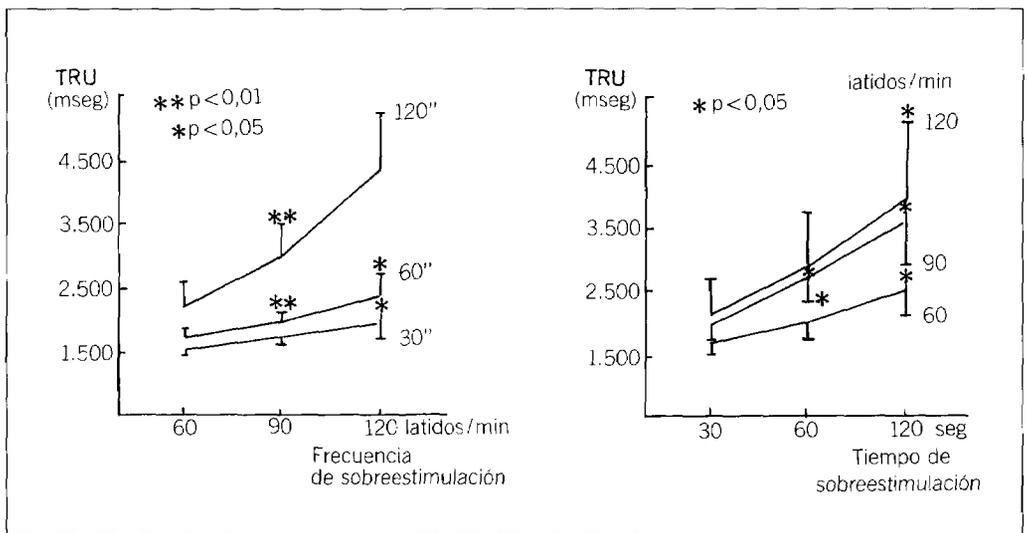
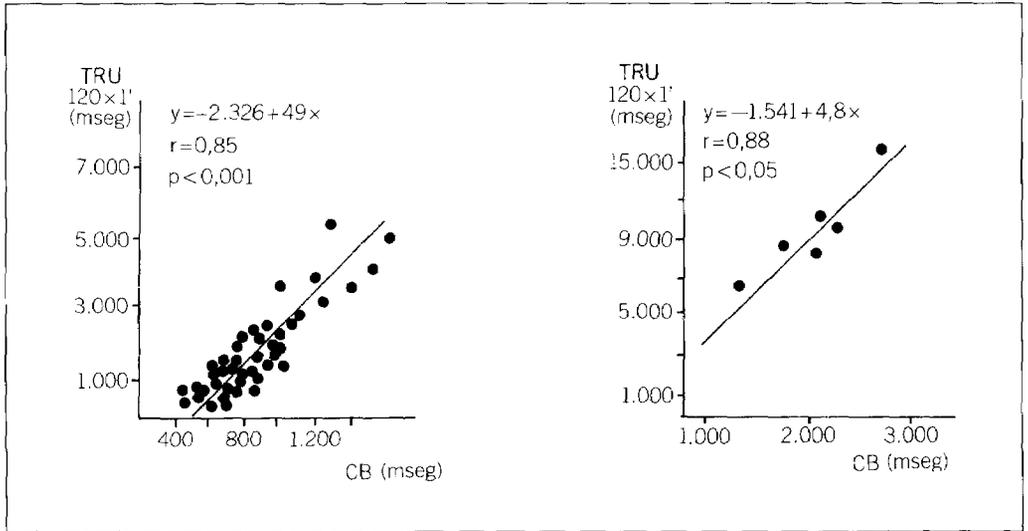
Respuesta al sistema nervioso autónomo. Los automatismos subsidiarios de la unión auriculoventricular se han mostrado sensibles a la estimulación simpática y parasimpática. Los automatismos nodohisianos han modificado su frecuencia por la estimulación eléctrica del vago y de los ganglios estrellados (fig. 5). Los auto-

matismos hisianos fueron sensibles a los neurotransmisores (isoproterenol, acetilcolina, prostigmina, atropina, bloqueadores beta). Los automatismos infrahisianos fueron sensibles a la estimulación eléctrica simpática y parasimpática, descendiendo la frecuencia del ritmo de escape e incrementándose el tiempo de recuperación de la unión auriculoventricular con la estimulación del vago cervical (figs. 7 y 8).

De modo similar y coincidiendo con otros autores, hemos podido comprobar como el automatismo de escape de los bloqueos intra e infrahisianos puede ser sensible al masaje del seno carotídeo, por lo que no se puede descartar al hipertono vagal como un desencadenante de los síncope en estos pacientes^{15,16}.

Respuesta a la sobreestimulación. Los automatismos de la unión auriculoventricular que hemos estudiado, tanto experimentales (hisianos e infrahisianos) como clínicos (bloqueo auriculoventricular completo de diversas localizaciones) han mostrado un comportamiento similar que es diferente al sinusal y al auricular que hemos descrito¹⁵:

1. Primera pausa, tiempo de recuperación de la unión auriculoventricular (TRU). Tras la sobreestimulación ventricular se produce una primera pausa que es significativamente más prolongada que el intervalo básico del ciclo del



marcapasos, y constituye el tiempo de recuperación del marcapasos de la unión auriculoventricular (TRU).

El TRU dependió en todas las series del ciclo básico del marcapasos (fig. 9), de los parámetros

de estimulación (frecuencia y tiempo de estimulación) (fig. 10) y de la actividad del sistema nervioso vegetativo. Ello obliga a utilizar siempre parámetros de estimulación estándar y repetibles, para poder obtener resultados com-

parables entre enfermos y entre distintas series. El TRU se prolongó con la estimulación eléctrica del vago cervical, hecho que está de acuerdo con nuestra experiencia sobre la sensibilidad de los automatismos subsidiarios al sistema nervioso parasimpático (fig. 8).

En la serie clínica el TRU también dependió del nivel del bloqueo, siendo los más prolongados los correspondientes a la localización infrahisiana (tabla II). La correlación entre el ciclo básico del marcapasos y el TRU, con parámetros de estimulación similares, permitió descubrir dos tipos de comportamiento diferentes entre pacientes con síncope y pacientes sin síncope. Los pacientes con síncope presentan una mayor sensibilidad a la sobreestimulación con un TRU anormalmente más prolongado (fig. 11). De este modo el TRU depende también de la enfermedad del marcapasos (tabla III).

2. Proceso completo de recuperación^{15,17}. Calentamiento de un foco: la depresión postestimulación en los marcapasos subsidiarios dura más que el primer ciclo. La frecuencia basal se alcanza de modo progresivo. En corazones aislados de cobayo este proceso se realiza a través de: a) Una primera fase de recuperación rápida, que supone los ciclos iniciales y medios y recupera el 70 % del ciclo básico, y b) una fase final de recuperación lenta (lineal). La recuperación rápida se puede asimilar a un movimiento uniformemente acelerado en el cual la aceleración (a) resultó ser independiente de los parámetros de estimulación y correlacionó estrechamente con el ciclo básico (fig 12, 13).

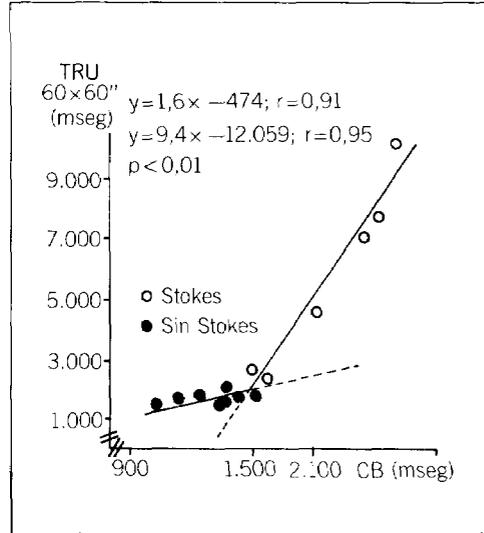


Fig. 11. Pacientes con bloqueo auriculoventricular completo de diversas localizaciones. El TRU depende del ciclo básico (CB), pero se puede observar cómo es posible trazar dos líneas de regresión diferentes ($p < 0,01$) entre los pacientes que habían padecido crisis de Stokes y los que no (véase texto).

En las series clínicas se estudió este fenómeno, y en cinco de 9 pacientes la recuperación se producía mucho más rápidamente de lo esperado, de modo similar a lo que ocurre en el

Fig. 12. Preparaciones de corazón aislado sin aurículas. Ritmo hisiano de escape. Se puede observar cómo los intervalos R-R se van acortando progresivamente siguiendo un modelo uniformemente acelerado, con una aceleración (a) calculada similar para frecuencias de estimulación diferentes (240, 180 y 120 latidos/min). Este modelo de movimiento uniformemente acelerado alcanza hasta una recuperación de un ciclo básico que es un 30 % más largo que el basal. Posteriormente la recuperación sigue un modelo lineal hasta la recuperación total (TRT).

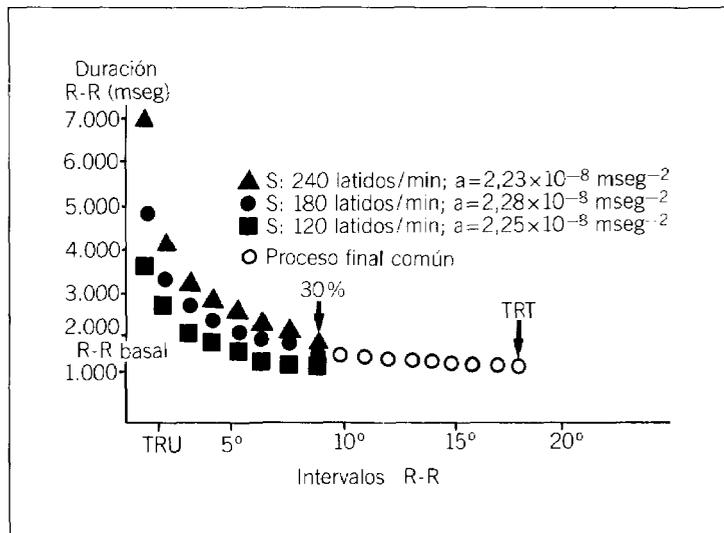


TABLA II
TRU Y NIVEL DEL BLOQUEO

	Suprahisiano	Intrahisiano	Infrahisiano
TRU 60×60 seg (mseg)	1.814 ± 558 n=7	2.046 ± 1197 n=4	5.501 ± 3.330 n=6
R-R (mseg)	1.250 ± 223	1.205 ± 202	1.900 ± 299

$p < 0,02$ (entre Suprahisiano e Intrahisiano)
 $p < 0,01$ (entre Intrahisiano e Infrahisiano)

TABLA III
TRU E INC.DENCIA DE STOKES

	Stokes		Sin Stokes
TRU 60×60 seg (mseg)	5.635 ± 3.154	$p < 0,01$	1.611 ± 262,9
TRU 90×60 seg (mseg)	7.513 ± 3.900	$p < 0,05$	3.318 ± 2.082

nódulo sinusal, probablemente por reflejo adrenérgico originado por la primera pausa. Por ello, aquellos procesos de recuperación excesivamente lentos implican una anomalía del marcapasos (fig. 14).

Respuesta a la estimulación ventricular eléctrica programada. Tanto en ritmos hisianos de preparaciones de corazón aislado como en perros con bloqueo auriculoventricular por ablación eléctrica como en pacientes con bloqueo auriculoventricular espontáneo de diferente localización

(6 intrahisiano y 12 infrahisiano) se ha comprobado que¹⁵⁻¹⁸: a) estímulos únicos con cualquier período de acoplamiento no inducen depresión del ritmo de escape; b) la respuesta a la estimulación eléctrica programada es diferente a la obtenida a nivel del nódulo sinusal, la llamada zona I del diagrama de Straus es muy corta, la zona II es generalmente predominante, y la zona III aparece sólo en algunos casos (16 %) (fig. 14), y c) ni el bloqueo autonómico ni la estimulación eléctrica del vago o la perfusión de acetilcolina o isoproterenol modificó el tipo de respuesta obtenido.

Por tanto, creemos que ciclos de retorno anormalmente prolongados son un signo de enfermedad del automatismo subsidiario.

Respuesta a fármacos. Los automatismos subsidiarios se deprimen por prácticamente todos los fármacos antiarrítmicos prolongando el intervalo R-R y también prolongando el tiempo de recuperación de la unión auriculoventricular. Sólo los fármacos antagonistas del calcio aceleran el ritmo de escape de la unión auriculoventricular y acortan el TRU; estos efectos se han podido demostrar de igual modo en preparaciones de corazón aislado, en perros anestesiados con tórax abierto, en perros despiertos con bloqueo auriculoventricular crónico por ablación y tras bloqueo autonómico y en pacientes con bloqueo auriculoventricular^{15,19-22}.

Esta característica constituye otra diferencia con respecto al automatismo sinusal y al auricular, debe ser secundaria a diferencias en el mecanismo iónico y al ser discriminante de automatismos puede resultar de utilidad ante depresiones sinusales y auriculares por mecanismos que antagonicen el calcio¹⁹.

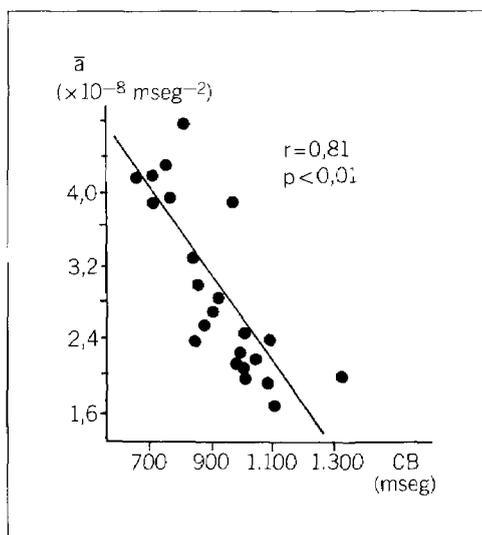
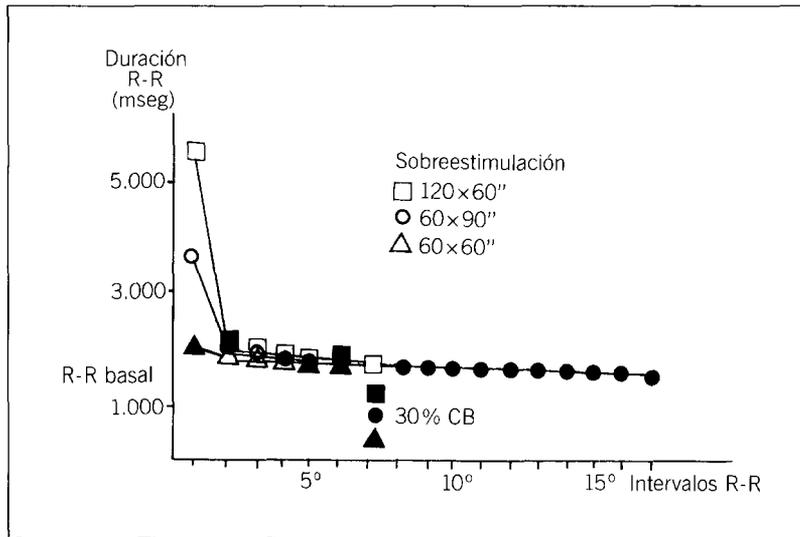


Fig. 13. Preparaciones de corazón aislado de caballo. Correlación entre la aceleración (a) (véase texto y figura 12) y la duración del ciclo básico (CB).

Fig. 14. Mismo tipo de diagrama que el de la figura 12, pero en un paciente con bloqueo auriculoventricular completo intrahisiano. Se produce una recuperación del ciclo básico prácticamente en el segundo latido de escape, no pudiéndose aplicar las consideraciones teóricas del modelo experimental, por lo que no admite el cálculo de la aceleración (a) (véase texto).



Conclusiones

El automatismo cardíaco es una propiedad de todo el corazón, no sólo del nódulo sinusal.

Los automatismos subsidiarios deben considerarse fisiopatológicamente normales.

Las características electrocardiográficas, electrofisiológicas, la dependencia del SNA y la respuesta a los fármacos cardioactivos son diferentes para cada tipo de automatismo.

Estas características diferenciales deben utilizarse para la cualificación e interpretación de los automatismos cardíacos en situaciones clínicas.

Una unidad de investigación de cardiología es un punto de encuentro entre las preguntas que se plantea un profesional que trabaja en cardiología y unos medios adecuados para resolverlos.

Los medios de investigación en cardiología pueden ser experimentales y/o clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

- GARCÍA CIVERA R, CABADÉS A, COSÍN J. Automatismo y conducción cardíacos, 2.^a ed. Barcelona, MCR, 1987.
- NOBLE D. The initiation of the beat. Oxford, Clarendon Press, 1975.
- SAITO T, OTOGURO M, MATSABARA T. Electrophysiological studies on the mechanism of electrically induced sustained rhythmic activity in the rabbit right atrium. *Circ Res* 1978; 42:199-206.
- LLACER A, COSÍN J, GARCÍA CIVERA R, MAINAR V. Fisiopatología de la conducción y el automatismo auricular. En: García Civera R, Cabadés A, Cosín J, eds. Automatismo y conducción cardíacos, 2.^a ed. 1987; 237-275.
- JONES SB, ENLER DE, HARDIE E, RANDALL WC, BRYNJOLESSON G. Comparison of SA nodal and subsidiary atrial pacemaker function and location in the dog. *Am J Physiol* 1978; 234:471-476.
- RANDALL WC, TALAMO J, KAYE MP, ENLER D, JONES S, BRYNJOLESSON G. Cardiac pacemakers in absence of SA node responses to exercise and autonomic blockade. *Am J Physiol* 1978; 234H:465-470.
- LOEB JM, ENLER DE, RANDALL WC, MORAN JF, BRYNJOLESSON G. Cardiac arrhythmias after chronic embolization of the sinus node artery: Alterations in parasympathetic pacemaker control. *Circulation* 1980; 61:192-198.
- ENLER DE, JONES SB, GUNNAR WP, SLEBA JM, MURDOCK DK, RANDALL WC. Cardiac arrhythmias in the conscious dog after excision of the sinoatrial node and crista terminalis. *Circulation* 1979; 59:468-475.
- COSÍN J, HERNÁNDEZ A, COLLADO V, SALVADOR A, CAMANAS A, MARTÍN G. Automatismo auricular subsidiario. 6.^o Seminario Internazionale di Cardiologia. Proceedings Book. Prof. Furlanello. Marilleva (Trento) 1984.
- LOEB JM, MURDOCK DK, RANDALL WC, ENLER DE. Supraventricular pacemaker underdrive in the absence of sinus nodal influences in the conscious dog. *Circ Res* 1979; 44:329-334.
- RABINE LM, HÖRDOF AJ, DANILO P, MALM JR, ROSEN MR. Mechanisms for impulse initiation in isolated human atrial fibers. *Circ Res* 1980; 47:267-277.
- COSÍN J. Clínica y diagnóstico de la enfermedad del nódulo sinusal. En: Bayés A, Cosín J, eds. Diagnóstico y tratamiento de las arritmias cardíacas. Barcelona, Doyma, 1978; 476-486.

13. FERRER I. Significance of slow atrial rhythm. *Am J Cardiol* 1980; 46:176-177.
14. JAMES TN, ISOBE JH, URTHALER F. Correlative electrophysiological and anatomical studies concerning the site of origin of escape rhythm during complete atrioventricular block in the dog. *Circ Res* 1979; 45:108-119.
15. COSÍN J, CABADÉS A, FERRANDO C, GIMENO JV, HERNÁNDEZ A. Fisiopatología y farmacología del automatismo subsidiario de la unión auriculoventricular. En: García Civera R, Cabadés A, Cosín J, eds. *Automatismo y conducción cardíacos*, 2º ed. Barcelona, MCR, 1987; 347-383.
16. CRISTALLO E, RIZZO A, CIFARELLI A, COLONNA L. Vagal inhibition of His-Purkinje automaticity in men. En: Furlanello F, Disertori M, Dieme G, eds. *Le Nouve Frontiere delle aritmia*, Trento 1982; 126-128.
17. COSÍN J, GIMENO JV, MARTÍN G, RUANO M, CABADES A, FERRANDO C. *New experimental parameters for evaluation of functional automaticity*. *Adv. Cardiol Karger Basel* 1981; 28:143-147.
18. FERRANDO C, COSÍN J, HERNÁNDEZ A, CABADES A. Programmed electrical stimulation of subsidiary pacemakers. *Experimental and Clinical study*. *N Trends arrhythm* 1986; 11:113-117.
19. COSÍN J, GIMENO JV, LASTRA L, MARTÍN G, GARCÍA DE JALÓN PA, BAGUENA J. Efecto de los fármacos antiarrítmicos sobre el automatismo de la unión auriculoventricular. Estudio experimental. *Rev Lat Cardiol* 1980; 1:50-59.
20. COSÍN J, GIMENO JV, CABADÉS A, FERRANDO C, RUANO M, BAGUENA J. Effect of calcium antagonist drugs on overdrive suppression in junctional pacemakers. *Pace* 1981; 4:A-6.
21. HERNÁNDEZ A, COSÍN J, COLLADO V, MARTÍNEZ FABRA J, CABADES A, FERRANDO C. Effect of autonomic blockade and nifedipine on junctional recovery time in dogs with block by His bundle ablation. En: Pérez Gómez F, ed. *Cardiac pacing electrophysiology tachyarrhythmias*. Madrid, Grouz 1985, y Nueva York, Futura Publishing Co., 1985; 41-46.
22. COSÍN J, HERNÁNDEZ A, COLLADO V, CABADÉS A, FERRANDO C, SALVADOR A. *Antiarrhythmic drug effects on ventricular subsidiary pacemakers in conscious dogs with chronic AV block*. En: Pérez Gómez F, ed. *Cardiac Pacing*. Madrid, Grouz 1985, y Nueva York, Futura Publishing Co., 1985; 47-53.

DISCUSIÓN

J. M. REVUELTA: Me ha parecido muy interesante el trabajo presentado por el Dr. Cosín, especialmente por la referencia a los automatismos subsidiarios auriculares, y su relación con el hecho de que los haces internodales no existan como tales, morfológicamente hablando, sino como sistemas funcionales. No puedo dejar de evocar que los haces internodales se describieron hace ya muchos años y que figuraban, incluso con los más mínimos detalles sobre su anatomía, en todos los libros de texto. Frente a estos conceptos contrastaba el hecho de que en intervenciones quirúrgicas importantes, como en la corrección de la transposición de grandes arterias, los cirujanos destruíamos —teóricamente— estas supuestas es-

estructuras y en el postoperatorio los pacientes conservaban el ritmo sinusal. Me gustaría conocer la opinión del Dr. Cosín al respecto.

J. COSÍN: En el momento actual, mi opinión sobre los haces internodales es que existen unas vías de conducción preferenciales en las aurículas, lo cual no implica en modo alguno que se trate de un tejido específico diferente al auricular banal. Se sabe que hay dos tipos de células auriculares, una de respuesta rápida y otra de respuesta lenta, y jalonando la aurícula existirían algunas zonas donde habría más células de este tipo. No se trata de una estructura anatómica, sino de una facilitación funcional, probablemente relacionada con los principios de la anisotropía miocárdica.

Sulfonilureas y metabolismo hepático de la glucosa*

J.E. Feliu

Servicio de Endocrinología Experimental de la Clínica Puerta de Hierro. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

Introducción

Tal como indica Lebovitz en un reciente artículo, la investigación clínica y básica sobre hipoglucemiantes orales se ha intensificado marcadamente desde 1980 hasta nuestros días. Entre las causas que este autor destaca figuran: a) el mejor conocimiento de la regulación del metabolismo de la glucosa y del mecanismo de acción de la insulina; b) los avances realizados en la comprensión de la fisiopatología de la diabetes mellitus, y c) los progresos recientes en la farmacología de la sulfonilureas.

Las sulfonilureas forman una de las familias de hipoglucemiantes orales, ampliamente utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II o diabetes de la madurez. El efecto hipoglucemiante de estos fármacos fue descubierto casualmente por Janbon et al² durante la Segunda Guerra Mundial, al observar cuadros de hipoglucemia en pacientes tifoideos tratados con cierta sulfonamida modificada. Experimentos llevados a cabo por Loubatières en animales permitieron establecer que la acción hipoglucemiante de la sulfonamida modificada tenía lugar por estimulación de la secreción de insulina³.

La primera sulfonilurea utilizada en la clínica fue la carbutamida, en realidad un agente antimicrobiano bastante tóxico que cayó pronto en desuso. En la década de los años cincuenta aparece la tolbutamida, sulfonilurea de uso muy extendido y con frecuencia empleada como modelo y referencia en estudios sobre las acciones metabólicas de estos fármacos.

La estructura química general de estos hipoglucemiantes orales se muestra en la figura 1. Son arilsulfonilureas con sustituciones en los grupos benceno y urea. Sin entrar en detalles estructurales, en una primera generación de estos fármacos podemos incluir a la tolbutamida, clorpropamida, tolazamida y acetohexamida. Posteriormente se desarrollaron las llamadas sulfonilureas de la segunda generación, caracterizadas por poseer en su estructura sustituyente más lipofílicos que dan a la molécula original una mayor potencia hipoglucemiante. En este grupo podemos incluir a la glibenclamida, glicipida y glibornurida, entre otras.

Si bien está fuera de toda duda que la acción hipoglucemiante de las sulfonilureas tras su administración aguda tiene lugar por la liberación de la insulina preformada presente en las células beta del páncreas⁴, el mecanismo de la acción hipoglucemiante en los tratamientos crónicos es todavía motivo de controversia^{5,6}. Numerosos estudios han demostrado que en los pacientes diabéticos tratados con sulfonilureas durante semanas o meses, en muchas ocasiones la mejoría en la glucemia no se acompaña de un aumento de la concentración de la insulina circulante. Ello parece indicar que la acción hipoglucemiante de las sulfonilureas en los tratamientos crónicos tienen que ver con acciones extrapancreáticas de estos fármacos, ejercidas sobre el hígado o los tejidos periféricos^{7,9}.

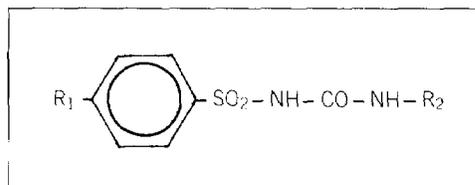


Fig. 1. Estructura química general de las sulfonilureas.

*Este trabajo ha sido realizado con Ayudas del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, Instituto Nacional de la Salud, y de la Comisión Asesora para la Investigación Científica y Técnica.

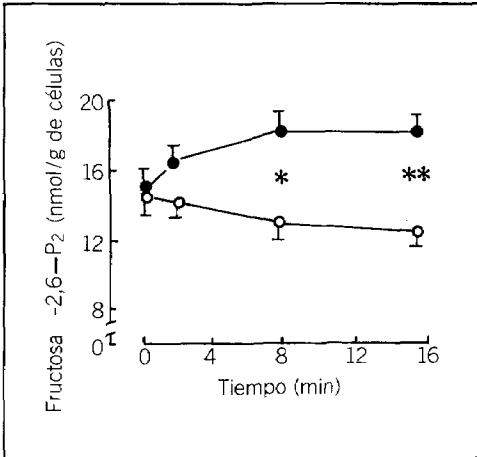


Fig. 3. Curso en el tiempo del efecto de la tolbutamida (1 mM) sobre los niveles de F-2,6-P₂ en hepatocitos aislados de rata. Las células fueron preincubadas en medio Krebs-Henseleit en presencia de glucosa (10 mM), antes de adicionarles salino (O) o tolbutamida (●). Los valores son la media ± EEM de tres experimentos. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (test de la t de Student) entre los hepatocitos control y los incubados con tolbutamida (*p < 0,05; **p < 0,01).

nes situadas en el rango de las detectadas en pacientes tratados crónicamente con estos fármacos²⁵, se añadieron directamente a la suspensión de hepatocitos. La gluconeogénesis se midió por la conversión de piruvato (U-¹⁴C) en glucosa²⁶. La concentración celular de F-2,6-P₂ se estimó según métodos enzimáticos habituales²⁷.

Resultados

Tal como muestra la figura 3, la presencia de tolbutamida (1 mM) en el medio de incubación provocó a los pocos minutos un aumento progresivo de los niveles de F-2,6-P₂, desde un valor de 14,6 ± 1,3 nmol/g de células a tiempo 0 min hasta valores de 18,0 ± 0,58 nmol/g de células tras 16 min de incubación (p < 0,05; n = 4 experimentos). En este momento de la incubación, la concentración de F-2,6-P₂ en los hepatocitos tratados con tolbutamida fue un 45 % más elevada que la medida en los hepatocitos control.

La acumulación de F-2,6-P₂ en los hepatocitos causada por la tolbutamida fue dependiente de la concentración de sulfonilurea

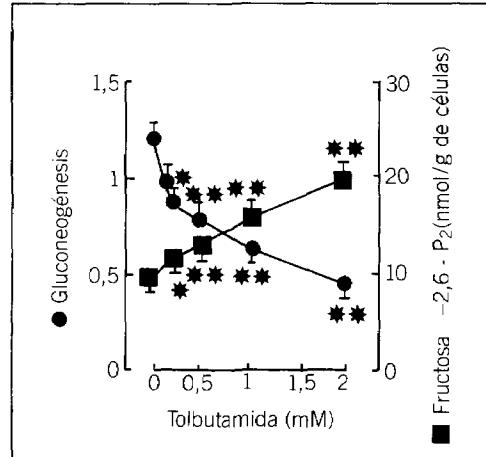


Fig. 4. Efecto de diferentes concentraciones de tolbutamida sobre la gluconeogénesis basal y sobre los niveles de F-2,6-P₂ en hepatocitos aislados de rata. Las células fueron incubadas durante 30 minutos en medio Krebs-Henseleit con glucosa 10 mM, en ausencia o en presencia de las concentraciones indicadas de sulfonilurea. Al cabo de este tiempo, el precursor gluconeogénico piruvato (U-¹⁴C) (2 mM) fue añadido al medio de incubación; 10 minutos más tarde, se tomaron alícuotas de la suspensión de células para valorar en ellas el F-2,6-P₂. La gluconeogénesis se expresa en micromoles de piruvato (U-¹⁴C) convertidos en glucosa/g de células y en 20 minutos. Los valores son la media ± EEM de 4 experimentos. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (test de la t de Student) entre los hepatocitos incubados en ausencia y en presencia de sulfonilurea (*p < 0,05; **p < 0,01).

empleada. En la figura 4 puede observarse cómo una concentración de tolbutamida de 0,2 mM ya provocó un pequeño pero estadísticamente significativo aumento de la concentración de F-2,6-P₂, en relación con los niveles de este metabolito medidos en hepatocitos incubados en ausencia de sulfonilurea (11,66 ± 1,28 versus 9,45 ± 1,16 nmol/g de células; n = 4 experimentos; p < 0,05). En la misma figura 4 se muestra cómo simultáneamente con el incremento de los niveles de F-2,6-P₂, con tolbutamida 0,5 mM, concentración situada en el intervalo de los valores detectados en el plasma de pacientes diabéticos tratados crónicamente con este fármaco²⁵, la gluconeogénesis basal fue inhibida en un 35 % (0,77 ± 0,05 versus 1,18 ± 0,13 μmol de piruvato (U-¹⁴C) convertidos en glucosa/g de células × 20 minutos; n = 4

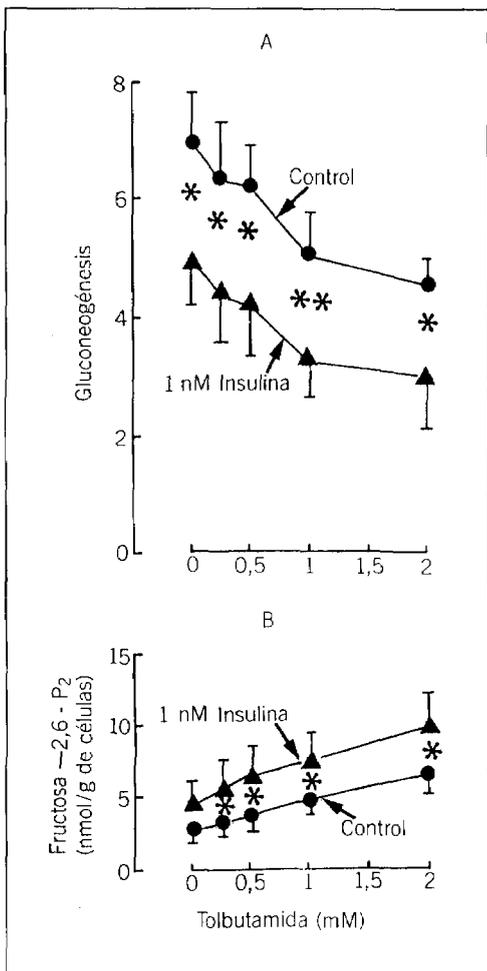


Fig. 5. Efecto de diferentes concentraciones de tolbutamida sobre la gluconeogénesis estimulada por una concentración subóptima de glucagón (0,3 nM) (A) y sobre los niveles de F-2,6-P₂ (B), en hepatocitos aislados de rata incubados en ausencia (círculos) o en presencia (triángulos) de insulina 1 nM. Las células se aislaron de ratas normalmente alimentadas y fueron incubadas en medio Krebs-Henseleit con glucosa 10 mM durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo, el glucagón y el precursor gluconeogénico, así como la tolbutamida o el salino, fueron añadidos a la suspensión de células. Cuando la insulina estuvo presente en la incubación, ésta se añadió 3 minutos antes que el glucagón. Los valores son la media ± EEM de 5 experimentos. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre los hepatocitos incubados en ausencia y en presencia de insulina (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). La gluconeogénesis se expresa en micromoles de piruvato ($U-^{14}C$) convertidos en glucosa/g de células por 20 minutos.

experimentos; $p < 0,01$). Además en esta serie de experimentos se pudo establecer una estrecha relación inversa entre la concentración de F-2,6-P₂ en los hepatocitos y la velocidad del flujo gluconeogénico ($r = 0,953$; $n = 4$ experimentos; $p < 0,01$).

Tal como se ha mencionado, las sulfonilureas pueden también afectar el metabolismo hepático de la glucosa potenciando la acción de la insulina^{11,12}. En este sentido, estudiamos el efecto combinado de la insulina y de la tolbutamida tanto sobre los niveles de F-2,6-P₂ como sobre el flujo gluconeogénico, en hepatocitos incubados con una concentración subóptima de glucagón (0,3 nM). Es bien conocida la capacidad de la insulina para antagonizar los efectos metabólicos de concentraciones subóptimas de glucagón²⁸.

En la figura 5A se muestra cómo concentraciones crecientes de tolbutamida provocan la progresiva inhibición del flujo gluconeogénico en los hepatocitos tratados con glucagón. Así mismo, esta sulfonilurea fue capaz de potenciar la conocida acción inhibitoria de la insulina sobre la gluconeogénesis estimulada por esta hormona hiperglucemiante.

En justa correspondencia con los datos publicados en la literatura^{22,23}, los niveles de F-2,6-P₂ medidos en los hepatocitos tratados con glucagón muestran una marcada disminución (fig. 5B). Sin embargo, la presencia de tolbutamida en el medio de incubación, simultáneamente con su efecto inhibitorio de la gluconeogénesis, incrementó los niveles celulares de F-2,6-P₂, muy disminuidos por efecto de esta hormona. La tolbutamida potenció también la acción de la insulina incrementando los niveles celulares de este metabolito regulador (fig. 5B), ya que la presencia conjunta de insulina y tolbutamida en el medio de incubación provocó un mayor aumento de los niveles de F-2,6-P₂ en los hepatocitos que cuando actuaron cada uno de estos agentes por separado.

Comentario

Como ya hemos indicado, estudios llevados a cabo tanto *in vivo*^{18,19} como *in vitro*^{7,9} han demostrado que las sulfonilureas pueden disminuir la producción hepática de glucosa por acción directa sobre el hígado. Además, existen evidencias de que estos fármacos pueden potenciar la acción de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa en diferentes tejidos^{5,17,18}. Sin embargo, el mecanismo por el cual las sulfonilureas ejercen sus acciones me-

tabólicas en tejidos extrapancreáticos es todavía motivo de controversia^{1,5}.

Recientemente, resultados obtenidos por nuestro grupo^{27,29} y también en el laboratorio de Kaneko^{30,31} han mostrado cómo las sulfonilureas pueden incrementar los niveles de F-2,6-P₂, respectivamente, en hepatocitos aislados de rata y en preparaciones de hígado perfundido. De acuerdo con el papel relevante de este metabolito en el control de los flujos glucolítico y gluconeogénico en el hígado, el aumento de los niveles de F-2,6-P₂ causado por las sulfonilureas se acompaña de una aceleración de la producción de lactato, así como de una inhibición de la gluconeogénesis hepática, tal como se ha mostrado en este trabajo. Hay que añadir que resultados semejantes se han obtenido con hepatocitos aislados de ratas diabéticas por tratamiento con aloxana o estreptozotocina²⁹.

Así pues, si el mecanismo de acción aquí descrito fuese operativo *in vivo* en el animal diabético podría dar cuenta tanto de los efectos directos de las sulfonilureas disminuyendo la producción hepática de glucosa, como de la acción potenciadora de la insulina ejercida por estos fármacos a nivel hepático. De esta forma, las sulfonilureas podrían ejercer su acción hipoglucemiante en los tratamientos crónicos independientemente de su acción a nivel pancreático.

Evidentemente, quedan todavía muchas incógnitas por resolver acerca de la acción de las sulfonilureas a nivel extrapancreático. Una de ellas es sin duda saber cómo las sulfonilureas incrementan los niveles hepáticos de F-2,6-P₂. Uno de los aspectos de las acciones de estos fármacos está siendo actualmente investigado en nuestro laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- LEBOVITZ HE. Oral hypoglycemic agents. En: Alberti KGMM, Krall L, eds. The Diabetes Annual. Amsterdam, Elsevier, 1985; 93-110.
- JANBON M, CHAPTAL J, VEDEL A, SCHAAP J. Accidents hypoglycémiques graves par un sulfamidothiazol. Montpell Med, 1942; 21-22: 441-444.
- LOUBATIERES A. The discovery of hypoglycemic sulfonamides and particularly of their action mechanism. Acta Diabet Lat 6 (supl 1): 1969; 20-56.
- GRODSKY GM, EPSTEIN GH, FANSA R, KARAM JH. Pancreatic actions of sulfonylureas. Fed Proc 1977; 36:2.714-2.719.
- FELDMAN JM, LEBOVITZ HE. Appraisal of the extrapancreatic actions of sulfonylureas. Arch Intern Med 1969; 123:314-322.
- KOLTERMAN OG, GRAY RS, SHAPIRO G, SCARLETT JA, GRIFFIN J, OLEFSKY JM. The acute and chronic effects of sulfonylurea therapy in Type II diabetics subjects. Diabetes 1984; 33:346-354.
- LEVEY GS. The effects of sulfonylureas on peripheral metabolic processes. Fed Proc 1977; 36: 2.720-2.723.
- DAVIDOFF F. Hepatic effects of oral hypoglycemic drugs. Fed Proc 1977; 36:2.724-2.727.
- LEBOVITZ HE, FEINGLOS MN. Sulfonylurea drugs: mechanisms of antidiabetic action and therapeutic usefulness. Diabetes Care 1978; 1:189-198.
- COLWELL AR. Potentiation of insulin action on the liver by tolbutamide. Metabolism 1964; 13: 1.310-1.317.
- BLUMENTHAL SA. Potentiation of the hepatic action of insulin by chlorpropamide. Diabetes 1977; 26: 485-489.
- SALHANICK AI, KONOWITZ P, AMATRUDA JM. Potentiation of insulin action by a sulfonylurea in primary culture of hepatocytes from normal and diabetic rats. Diabetes 1983; 32:206-212.
- OLEFSKY JM, REAVEN GM. Effects of sulfonylurea therapy on insulin binding to mononuclear leukocytes of diabetic patients. Am J Med 1976; 60:89-95.
- FEINGLOS MN, LEBOVITZ HE. Sulfonylureas increase the number of insulin receptors. Nature 1978; 276: 184-186.
- PRINCE MJ, OLEFSKY JM. Direct *in vitro* effect of a sulfonylurea to increase human fibroblast insulin receptor. J Clin Invest 1980; 66:608-611.
- POYET C, FELDMAN J. Effect of chronic tolbutamide administration on normal and obese-hyperglycemic mice: evidence for post-receptor potentiation in insulin action. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1982; 35:355-359.
- WARD G, HARRISON LC, PROIETTO J, AITKEN P, NAUKERVIS A. Gliclazide therapy is associated with potentiation of postbinding insulin action in obese non-insulin dependent diabetic subjects. Diabetes 1985; 34:241-246.
- MANDARINO NJ, GERICH JE. Prolonged sulfonylurea administration decreases insulin resistance and increases insulin secretion in non-insulin dependent diabetes mellitus: evidence for improved insulin action at a postreceptor site in hepatic as well as extrahepatic tissues. Diabetes Care 1984; 7 (supl 1):89-99.
- DE FRONZO RA, SIMONSON DC. Oral sulfonylurea agents suppress hepatic glucose production in non-insulin dependent diabetic individuals. Diabetes Care 1984; 7 (supl 1):72-80.
- HERS HG, VAN SCHAFTINGEN E. Fructose 2,6-bisphosphate: 2 years after its discovery. Biochem J 1982; 206:1-12.
- HERS HG, HUE L. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. Ann Rev Biochem 1983; 52:617-653.
- PILKIS SJ, EL-MAGHRABI MR, McGRANE M, PILKIS J, FOX E. Fructose 6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate

- hosphate substrate cycle. *Mol Cell Endocrinol* 1982; 25:245-266.
23. UYEDA K, FURUYA E, RICHARDS CS, YOKOHAMA M. Fructose 2,6-P₂: chemistry and biological functions. *Mol Cell Biochem* 1982; 48:97-120.
 24. FELIU JE, HUE L, HERS HG. Hormonal control of pyruvate kinase activity and of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73:2.762-2.766.
 25. MELLANDER G, SARTOR G, WAHLIN E, SCERSTEN B, BITZEN PO. Serum tolbutamide and chlorpropamide concentrations in patients with diabetes mellitus. *Br Med J* 1978; 1:142-144.
 26. FELIU JE, MOJENA M, SILVESTRE RA, MONGE L, MARCO J. Stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide on glycogenolysis and gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes: Antagonism by insulin. *Endocrinology* 1983; 112:2.120-2.125.
 27. MONGE L, MOJENA M, ORTEGA JL, SAMPER B, CABELLO MA, FELIU JE. Chlorpropamide raises fructose 2,6-bisphosphate concentration and inhibits gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* 1986; 35:89-96.
 28. EXTON JH, MALLETT LE, JEFFERSON LS, WONG EHA, FRIEDMAN N. Hormonal control of hepatic gluconeogenesis. *Rec Prog Horm Res* 1970; 26: 411-457.
 29. CABELLO MA, MONGE L, ORTEGA JL, SAMPER B, FELIU JE. Effect of glipizide on hepatic fructose 2,6-bisphosphate concentration and glucose metabolism. *Metabolism* 1987 (en prensa).
 30. MATSUTANI A, KAKU K, KANEKO T. Tolbutamide stimulates fructose 2,6-bisphosphate formation in perfused rat liver. *Diabetes* 1984; 33:495-498.
 31. KAKU K, MATSUDA M, MATSUTANI A, KANEKO T. Effect of tolbutamide on fructose 6-phosphate 2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 139:687-692.

DISCUSIÓN

J.V. CASTELL: Tengo una pregunta inmediata a hacer. No sé si lo ha mencionado pero creo entender que este tipo de respuesta se ha obtenido con hepatocitos normales. ¿Es así?

J.E. FELIU: Sí, y también con hepatocitos obtenidos de ratas diabéticas.

L. AGUILERA: ¿Y cómo responden los hepatocitos de ratas diabéticas? ¿mejor?, ¿peor?, ¿de forma similar?, ¿es reproducible?

J.E. FELIU: Es reproducible en tanto no exista acetosis. En hepatocitos obtenidos de ratas diabéticas sin cetosis, existe un aumento de la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato potente y reproducible por la acción de las sulfonilureas. Lógicamente los resultados aquí presentados se refieren a estudios llevados a cabo con hepatocitos aislados mantenidos en suspensión, pero ¿qué ocurre en hepatocitos cultivados cuando se exponen a las sulfonilureas durante varios días?

Lo que hemos visto en células aisladas, puede ocurrir también en el animal con diabetes inducida con estreptotocina y en pacientes tratados con sulfonilureas.

J. BIGORRA: Me ha parecido entender que la teoría de los receptores estaba en descrédito; sin embargo, hay también datos que la apoyan. Mi pregunta sería si ambas teorías son combinables o mejor dicho si vislumbra usted la posibilidad de que sean combinables.

J.E. FELIU: Exactamente. Ese es un punto muy interesante. Se sabe que las sulfonilureas no aumentan la insulínogénesis, según se ha demostrado en animales tratados con estos fár-

macos, y en cultivos de células betapancreáticas. Es decir, la cantidad de insulina que sintetiza el páncreas de un animal no aumenta al tratarlo durante semanas con sulfonilureas, sino que la insulínogénesis incluso puede disminuir. En los estudios encaminados a evaluar la influencia de las sulfonilureas sobre el número de receptores de insulina en los monocitos circulantes de pacientes tratados con estos fármacos, es importante tener en cuenta la insulinemia previa al tratamiento, que en general está normal o elevada en el paciente con diabetes tipo II, que suele presentar resistencia a la insulina. Así, en el caso de existir hiperinsulinemia habrá una disminución del número de receptores de insulina en los tejidos diana por un fenómeno de *down regulation*. Por tanto, tras un tratamiento crónico con sulfonilureas que provocara una disminución de la insulínogénesis y de la insulinemia, sería pues de esperar un aumento del número de receptores en las células de los tejidos periféricos o un fenómeno de *up regulation*. Además, hemos de considerar el hecho demostrado de que el tratamiento con sulfonilureas disminuye la resistencia a la insulina del hígado y tejidos periféricos por un mecanismo situado a nivel postreceptor, es decir, modificando de alguna forma el metabolismo celular, con lo que los requerimientos de insulina disminuyen. De este modo se provocaría también un descenso de la insulinemia, lo que en consecuencia aumentaría el número de receptores de insulina en los tejidos diana.

J. GONZÁLEZ DE DIOS: Es curioso observar cómo en pocos años se ha pasado de atribuir todos los efectos al funcionalismo de la célula beta, después se centraron en el papel de los receptores periféricos y actualmente se habla de los efectos a nivel hepático. Recuerdo que hace algún tiempo se hablaba de la diabetes asociada a los distintos tipos de acantosis *nigricans* de una forma bastante esquematizada en cuanto al nivel etiológico de la patología, ya fuera prerreceptor, receptor o postreceptor. Quisiera preguntar al Dr. Feliu qué queda hoy día de estas teorías.

J.E. FELIU: Como pasa en todas las ramas de la ciencia, y el estudio de la diabetes no es una excepción, existen corrientes de opinión que van modificándose en función de los datos experimentales, es decir, cualquier descubrimiento nuevo pretende justificar todo lo anterior.

La causa de la diabetes que aparece asociada a la acantosis *nigricans* tipo A o tipo B es todavía motivo de estudio. Hay datos que apoyan la posibilidad de que en estos síndromes complejos exista una disminución del número de receptores. En otros casos lo que dis-

minuye es la afinidad del receptor, y en otros no se afecta ninguno de ambos aspectos; entonces lo que se postula es que la lesión está en la generación de la señal por el receptor. Se sabe que el receptor tiene una capacidad autofosforilante, y parece ser en que algunos casos de diabetes por acantosis *nigricans* tipo B, ni el número ni la afinidad de los receptores ha cambiado, lo que ocurre es que el receptor ha perdido la capacidad autofosforilante. Si ésta es la causa de la diabetes o de la falta de respuesta a la insulina, es algo que está todavía en estudio. Además, y esto es muy reciente, en los últimos meses Shaltiel, en EE.UU., y José M.^a Mato en España han descrito un probable oligosacárido que se genera por tratamiento de células con insulina y que es capaz de simular las acciones de la misma. Este oligosacárido podría ser, y esto es sólo hipotético, ese segundo mensajero de la insulina cuya búsqueda ha ocupado a un gran número de investigadores durante muchos años. Entonces puede lógicamente haber diabetes por falta de generación del segundo mensajero. Este sigue siendo un tema abierto a la investigación.

Estudio clínico experimental de la reparación ósea

F. Girvent

Servicio de Traumatología. Hospital de Sabadell, Clínica Santa Fe. Sabadell. Barcelona.

El callo óseo constituye una concatenación de fenómenos que se desencadenan después de la lesión mecánica del hueso. En este proceso pueden influir múltiples causas, tanto locales (tensión mecánica, vascularización del hueso, tipo de hueso, etc.), como generales (edad, enfermedades sistémicas, fármacos, etc.). La formación, espontánea, del callo óseo tiende a la consolidación de la fractura. Las manipulaciones del foco de fractura que realiza el cirujano para obtener una restitución anatómica del hueso, que permite una función correcta, tienden a entorpecer este fenómeno, en mayor o menor cuantía, dependiendo de la técnica utilizada. Como ilustración de esta idea, observamos con el Dr. J. Huguet cómo en las ratas albinas las fracturas aleatorias de huesos diafisarios de la pata posterior siempre curaron con un exuberante callo óseo, aunque con evidentes deformidades anatómicas de todo tipo, especialmente con gran acortamiento del miembro (fig. 1). Aunque este experimento no sea extrapolable, aporta datos acerca de la espontaneidad del proceso y cómo las manipulaciones para obtener una buena reducción, en aras de una correcta función, pueden entorpecer el proceso de curación, al lesionar la vascularización y alterar mecánicamente la zona.

Comportamiento del callo óseo

Estudios experimentales

Junto con el Dr. Domingo, postulamos que era posible trasplantar un fragmento de periostio hipertrofiado previamente por una irritación química del hueso, a una zona de hueso reseca y excluida mecánicamente por una osteosíntesis estable, para así observar su capacidad osteogénica.

Tomamos como animal de experimentación al perro, fundamentalmente por motivos de dis-

ponibilidad, y realizamos una resección ósea de 2 cm en la diáfisis femoral, estabilizándola mediante un clavo intramedular fijado al hueso por tres tornillos a cada lado de la osteotomía.

En los casos en que el montaje era estable, se observó un progresivo engrosamiento de la cortical ósea en la zona de anclaje, con reabsorción del hueso de la zona mecánicamente excluida (fig. 2); en estos casos se realizó el trasplante de periostio hipertrofiado en un grupo, dejando el resto de testigo, obteniéndose así una consolidación ósea significativamente superior a la del grupo testigo. Las biopsias seriadas del



Fig. 1. Osteosíntesis estable. Obsérvese la reabsorción ósea en la zona mecánicamente excluida y el engrosamiento en las zonas de anclaje óseo.



Fig. 2. Osteosíntesis inestable. Gran reacción perióstica que acaba por pontear el área de resección ósea.



Fig. 3. Evolución espontánea a la consolidación de una fractura aleatoria del fémur de una rata de laboratorio.

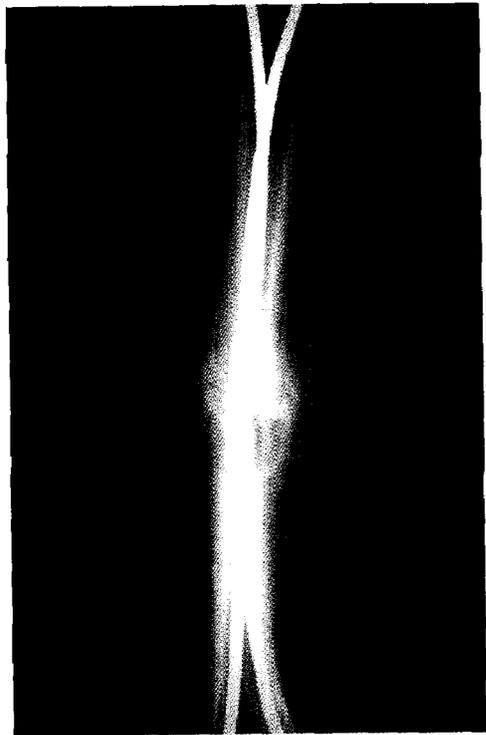
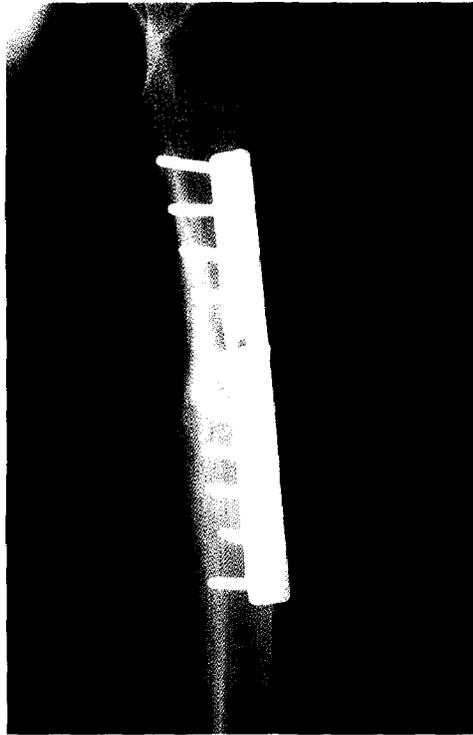


Fig. 4. A: osteosíntesis rígida. Espongialización de las corticales mecánicamente excluidas. B: osteosíntesis elástica. Gran respuesta perióstica con engrosamiento de las corticales.

tejido trasplantado mostraron una supervivencia de las células periósticas.

Si por el contrario el montaje no era estable, se provocaba una reacción perióstica progresiva, periostitis mecánica que acaba por englo-

bar al material de osteosíntesis muchas veces hasta conseguir la consolidación ósea del foco de osteotomía (fig. 3).

Independientemente del objetivo inicial, el trasplante de periostio hipertrofiado, observamos

cómo la exclusión del hueso del área de influencia mecánica comporta una reabsorción ósea. Esto nos hace ser críticos con los sistemas de fijación ósea excesivamente rígidos, que secuestran de forma excesiva la tensión mecánica en el foco de fractura.

Estudios clínicos

La observación de la evolución radiológica de los callos de fractura en la clínica nos permite ver que cuanto más rígido es el mecanismo de contención del hueso, menor y en general más lento es el callo obtenido, e incluso en las fijaciones con placas se observa una reabsorción de las corticales sometidas a osteosíntesis, fenómeno denominado esponjialización, producido por reabsorción ósea (fig. 4A). Los fijadores externos rígidos con frecuencia provocan retardos de consolidación, e incluso pseudoartrosis, por excesivo bloqueo de la tensión mecánica de compresión-distracción en el foco de fractura. Los métodos de estabilización ósea que producen callos óseos exuberantes son los que permiten una compresión axial intermitente y una carga precoz, con lo cual el proceso de reparación ósea se efectúa en el contexto de una carga progresiva, con lo que se obvian los problemas de distrofia osteomusculocutánea producidos por la falta de estímulo mecánico. A este grupo pertenecen los enclavados intramedulares (Kuntscher, Enders, etc.) y los fijadores externos como el de Ilizarov. También pro-

ducen callos óseos los yesos clásicos con carga precoz y los funcionales (fig. 4B).

Conclusiones

El callo óseo es un proceso activo que se desencadena en el momento de la lesión ósea, influenciado por múltiples factores locales y generales. Entre los factores locales, son muy importantes la calidad y cantidad de tensión mecánica a que se somete, demostrándose tanto clínica como experimentalmente que esta tensión mecánica sobre el callo óseo representa un estímulo osteogénico, especialmente la tracción-compresión intermitente, lo que se consigue mediante un sistema de contención del hueso que no la bloquee y a la vez permita una utilización precoz y progresiva del miembro afecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. TRUETA J. Estructura del cuerpo humano. Barcelona, Labor, 1978.
2. SEVIT S. Bone repair and fracture healing in man. Edinburg, Longman Group Limited, 1981.
3. TRUETA J, BURTH AJ. The vascular contribution to osteogenesis. *J Bone Jt Surg* 1963; 45B:572.
4. FERNANDEZ ESTEVE F. Tratamiento biológico de las fracturas. Valencia, 1980.
5. PHEMISTER DB. Biologic principles in the healing of fractures and their bearing on treatment. *Ann Surg* 1947; 133:433-446.

DISCUSIÓN

F.J. GONZÁLEZ DE DIOS: Aparte de los factores locales que influyen sobre el callo óseo, como la vascularización y el factor mecánico, recientemente se han descrito los posibles efectos beneficiosos de la electricidad. Me gustaría conocer su opinión sobre las potenciales aplicaciones terapéuticas de este hallazgo.

F. GIRVENT: Nosotros hemos utilizado esporádicamente este procedimiento con fines varios. Nosotros hemos aplicado unas corrientes farádicas intermitentes en forma de pulsos cuadrados, aunque hay otros métodos. Aparte de lo caro y engorroso que es, no nos ha parecido que se asociara a una clara diferencia en cuanto a una mejor evolución del callo de fractura. No obstante, mi experiencia con esta técnica es muy limitada. Lo que sí me gustaría recalcar es que la ausencia de estímulo me-

cánico en el foco de fractura es una causa de reabsorción ósea. Esta observación me parece muy importante, ya que cuando empecé a trabajar en estos temas se decía que lo fundamental era que el foco de fractura estuviera absolutamente fijo.

D. ANDREU: Me parece recordar que el efecto principal del fluido eléctrico se ejercía sobre los cristales de hidroxapatita. En otro orden de cosas, me gustaría que el Dr. Girvent nos hiciera un pequeño resumen sobre las dificultades que entraña montar un laboratorio de cirugía experimental.

F. GIRVENT: Personalmente tengo la suerte de trabajar en un centro donde gracias al empeño de una persona concreta, el Dr. Domingo, existe un laboratorio de cirugía experimental, con muchas limitaciones, pero que nos ha per-

mitido hacer muchas cosas. Aparte de las líneas de investigación que puedan desarrollarse, un laboratorio de este tipo es también extraordinariamente útil como centro de formación. En cuanto a los medios necesarios para montar un centro experimental, pienso que no se necesita gran cosa, ya que en experimentación la modestia es buena y el empezar con poco no diré que sea importante, pero no nos tiene que frenar. Por citar un ejemplo concreto, hubo una época en que este centro de cirugía experimental se cerró por dificultades económicas, ya que el mantenimiento de los animales con que trabajamos, concretamente perros, es muy caro; sin embargo, con la rata es distinto, por lo que empezamos a trabajar con ratas, pero para manipular quirúrgicamente un animal pequeño es necesario emplear la lupa. En este momento estamos haciendo microcirugía, es decir, que gracias al cataclismo económico del centro de cirugía experimental, actualmente podemos afirmar que somos uno de los centros reconocidos de microcirugía.

J. COSÍN: Me gustaría que el Dr. Girvent comentara con un poco más de detalle el significado del ejemplo que ha presentado de implante de periostio.

F. GIRVENT: Quizá no me haya explicado muy bien, puesto que en realidad lo que he pretendido presentar es una conclusión colateral de un proceso experimental. Nos planteamos una hipótesis experimental que parecía tener cierta validez de acuerdo con los datos de la literatura. Sin embargo, lo que observamos es que cuando se extraía un fragmento de hueso y se mantenía mecánicamente silente, el hueso no solamente no proliferaba, sino que se reabsorbía, y cuando esta osteosíntesis estable no se producía por fracaso del procedimiento, entonces se producía esta proliferación. Este hallazgo nos llevó a dudar de que la osteosíntesis rígida, la fijación rígida de un foco de fractura fuera favorable para la consolidación de la misma. Es decir, al seguir una línea experimental surgieron hallazgos colaterales más relevantes que el planteamiento original.

Estudio de la adhesión plaquetaria mediante técnicas de perfusión. Su interés clínico y experimental

A. Ordinas, E. Bastida, G. Escolar y R. Castillo

Servicio Hemoterapia y Hemostasia. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

Introducción

La interacción de las plaquetas con el subendotelio es uno de los primeros eventos que tiene lugar al desencadenarse el mecanismo de la hemostasia^{1,2}. La monocapa de células, que tapiza los vasos sanguíneos, no es reactiva para las plaquetas y por lo tanto la adhesión de las mismas sobre el endotelio vascular no se produce en condiciones de integridad vascular; sin embargo, la pérdida de una o varias células endoteliales produce la exposición de la denominada matriz extracelular, cuya composición tiene propiedades activadoras. Cuando se produce la lesión vascular, las plaquetas circulantes entran en contacto con los componentes del subendotelio emitiendo pseudópodos y extendiéndose sobre la zona expuesta³. Las plaquetas activadas liberan el contenido de sus gránulos, los cuales, entre otras sustancias activas, liberan productos que favorecen la interacción plaqueta-plaqueta, y que inician la formación de los agregados plaquetarios. Entre los productos liberados por las plaquetas hay también factores quimotácticos y mitogénicos, los cuales promueven la migración y la proliferación de las células musculares lisas. Este fenómeno constituye una importante fase en los procesos de reparación vascular, pero también se relaciona con la patogénesis de la metástasis y la arteriosclerosis^{4,5}.

Se han descrito varios factores que modulan la interacción de las plaquetas con el subendotelio vascular. El transporte de las plaquetas hacia la zona periférica del vaso está influenciado por ciertos parámetros de naturaleza mecánica y hemodinámica, tales como el coeficiente de cizallamiento, el hematócrito y el tamaño y deformabilidad de los hematíes⁶⁻⁸. Aparte de estos factores físicos, la reactividad de varios

componentes subendoteliales es así mismo importante en la interacción de las plaquetas.

El subendotelio vascular está constituido por diferentes tipos de colágenos, tejido elástico, proteoglicanos y proteínas tales como laminina, nidogén, factor de von Willebrand, fibronectina y trombospondina^{9,10}. Ciertas proteínas plasmáticas están así mismo implicadas en la adhesión de las plaquetas a uno o varios de los componentes del subendotelio¹¹. Estas uniones se producen con participación de los receptores específicos existentes en la membrana plaquetaria¹².

Con el fin de estudiar detalladamente los fenómenos relacionados con la interacción de las plaquetas y el subendotelio vascular, se han desarrollado varios modelos experimentales, los cuales han tenido en cuenta los fenómenos reológicos que en condiciones fisiológicas regulan la mayor parte de estas interacciones.

De entre estos modelos experimentales denominados genéricamente sistemas de perfusión, los más utilizados son el sistema de perfusión anular de Baumgartner y el sistema de flujo laminar de Sakariassen.

Sistema de perfusión de Baumgartner

Consiste en un cámara de plástico en cuyo interior se ajusta un eje, también de plástico, en el cual se han colocado uno o dos segmentos vasculares evertidos. Dicho eje queda en la parte central de la cámara y puede ser expuesto al contacto de sangre circulante¹³. El espacio anular, calculado de forma que corresponde al lumen vascular humano, entre la superficie y la cámara exterior permanece constante. De esta forma los parámetros reológicos como el flujo y el coeficiente de cizallamiento pueden calcularse para simular un sistema fisiológico^{14,15}. La



Fig. 1. Detalle de la cámara de perfusión anular de Baumgartner.

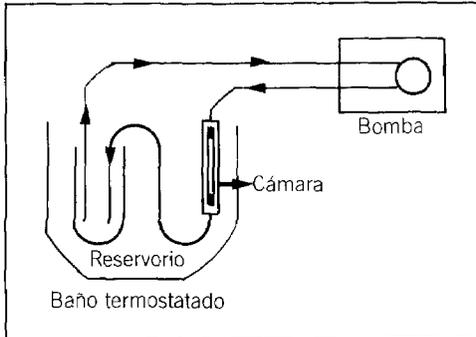


Fig. 2. Esquema completo del sistema de perfusión de Baumgartner.

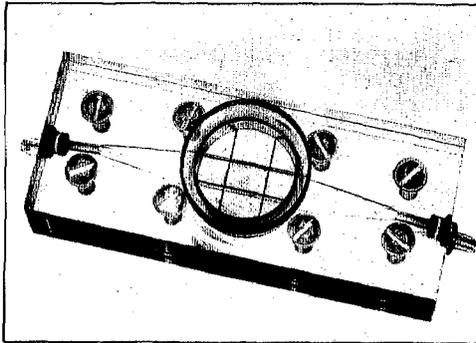


Fig. 3. Cámara de perfusión plana (Sakariassen).

figura 1 muestra en detalle la cámara de Baumgartner.

En este sistema de perfusión la sangre circula desde un reservorio a la bomba, la cual le confiere la velocidad deseada; después la sangre pasa a través de la cámara y vuelve al reservorio. Todo el sistema se halla termostatado a 37 °C.

En la figura 2 se puede observar un esquema del sistema de perfusión anular de Baumgartner.

Una vez transcurrido el tiempo de perfusión, las plaquetas que han interactuado con el segmento vascular perfundido pueden cuantificarse por métodos isotópicos, en el caso de que estas plaquetas hubieran estado previamente marcadas con algún isótopo radiactivo, o bien pueden valorarse por métodos morfométricos. La valoración morfométrica es mucho más exacta y permite un estudio más detallado de las plaquetas en interacción con el subendotelio, ya que permite no sólo una evaluación global del número de plaquetas, sino también conocer el estado de estas plaquetas en interacción¹⁷.

Sistema de perfusión en cámara plana

El modelo de perfusión en cámara plana (Sakariassen) consta de una cámara de plástico de dimensiones calculadas¹⁸ con una ranura interna, modelada en el plástico de la propia cámara, por la cual se hace circular la sangre impulsada por una bomba. En la zona interna de la cámara se coloca un cubreobjetos recubierto con la superficie elegida para el estudio de interacción plaquetaria (fig. 3). Esta superficie puede ser una proteína purificada o la matriz extracelular generada por las células endoteliales en cultivo. Las plaquetas interactúan con la mencionada superficie durante el tiempo de perfusión en las condiciones previamente fijadas, pudiéndose estudiar la reactividad de los distintos componentes del subendotelio¹⁹.

La evaluación de las plaquetas en interacción con la superficie perfundida se puede efectuar de la misma forma descrita para la técnica de perfusión continua de Baumgartner.

La aplicación de esta técnica de perfusión ha sido de gran utilidad para el estudio de la contribución de los distintos componentes del tejido subendotelial en la adhesión de las plaquetas y en la formación del trombo plaquetario²⁰.

Utilidad de las técnicas de perfusión

El desarrollo de los métodos de perfusión ha permitido no sólo profundizar en el conocimiento de los mecanismos reguladores de la interacción de las plaquetas al subendotelio, sino que además ha sido de gran ayuda para confirmar el diagnóstico de síndromes hemorrágicos previamente descritos, así como para el estudio de nuevas deficiencias plaquetarias y plasmáticas.

De esta forma se ha podido elucidar que la carencia de glucoproteína Ib en la membrana de las plaquetas en la enfermedad de Bernard

y Soulier se correlaciona directamente con un defecto en la adhesión de las plaquetas al subendotelio vascular²¹. También la ausencia del complejo glucoprotéico IIb/IIIa que ocurre en la trombostenia de Glanzman se ha asociado a los defectos de las plaquetas en cuanto a la capacidad de adherirse al subendotelio una vez han contactado con él, y a la facultad de formar agregados²².

Por otra parte, la utilización de los sistemas de perfusión bajo condiciones reológicas definidas ha permitido distinguir el papel de alguno de los factores plasmáticos que se presentan ausentes o deficitarios en ciertos tipos de patologías. Así, se ha podido observar el papel fundamental del factor de von Willebrand como puente de unión entre las plaquetas y el subendotelio, y que este proceso se presenta en zonas del árbol vascular donde se produce un elevado índice de cizallamiento, y no en otras zonas donde los coeficientes de colisión de las plaquetas con las estructuras del subendotelio son menores²³.

También se han utilizado estas técnicas para la elucidación de los mecanismos relacionados con las complicaciones trombóticas asociadas a la enfermedad cancerosa, estudiándose la acción trombogénica de distintos tipos de células tumorales humanas, así como los factores plasmáticos implicados en estos fenómenos de activación^{24,25}.

Como una de las últimas aplicaciones de los métodos de perfusión, tanto desde el punto de vista de investigación básica como de futuras perspectivas clínicas, hay que citar la utilización de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra epítopes determinados de las moléculas que intervienen en los fenómenos de interacción de las plaquetas con el subendotelio²⁶.

Por otra parte, ha sido de interés terapéutico la información obtenida con estas técnicas en cuanto a la determinación de la potencia relativa de distintos tipos de fármacos antiplaquetarios en la inhibición de la interacción de las plaquetas con el subendotelio vascular o de la interacción de las plaquetas entre sí²¹.

BIBLIOGRAFÍA

1. SIXMA JJ, WESTER J. The hemostatic plug. *Semin Hematol* 1977; 14:265-299.
2. SIXMA JJ. Role of blood vessel, platelet and coagulation interactions in haemostasis. En: Bloom AL,

- Thomas DP, eds. *Haemostasis and thrombosis*. Edimburgo, Churchill-Livingstone, 1981; 252-267.
3. WEISS HJ, TURITTO VT, BAUMGARTNER HR. Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood. I. Shear rate-dependent decrease of adhesion in von Willebrand's disease and the Bernard-Soulier syndrome. *J Lab Clin Med* 1978; 92:750-764.
 4. BASTIDA E, ESCOLAR G, ORDINAS A, GIARDINA LL, JAMIESON GA. Effects of divalent cations on the interaction of platelets with tumor cells: aggregation and perfusion studies with two homologous human systems. *J Lab Clin Med* 1985; 106:68-74.
 5. ROSS R, GLOMSET JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Eng J Med* 1976; 295:369-376.
 6. TURITTO VT, BAUMGARTNER HR. Platelet interaction with subendothelium in flowing rabbit blood: effect of blood shear rate. *Microvasc Res* 1979; 17:38-54.
 7. AARTS PAMM, HEETHAAR RM, SIXMA JJ. Red blood cell size is important for adherence of blood platelets to artery subendothelium. *Blood* 1983; 62:214-217.
 8. AARTS PAMM, HEETHAAR RM, SIXMA JJ. Red blood cell deformability influences platelets-vessel wall interaction in flowing blood. *Blood*, 1984; 64:1.228-1.233.
 9. SAKARIASSEN KS, BOLHUIS PA, SIXMA JJ. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* 1979; 279:636-638.
 10. KOTELIANSKY VE, LEYTN VL, SVIRIDOV DD, REPIN VS, SMIRNOV VN. Human plasma fibronectin promotes the adhesion and spreading of platelets on surfaces coated with fibrillar collagen. *FEBS Lett* 1981; 123:59-62.
 11. SAKARIASENN KS, BANGA JD, DE GROOT PG, SIXMA JJ. Comparison of platelet interaction with subendothelium of human renal and umbilical arteries and the extracellular matrix produced by human venous endothelial cells. *Thromb Haemost* 1984; 52:60-65.
 12. GEORGE JN, NURDEN AT, PHILLIPS DR. Molecular defects in interactions of platelets with the vessel wall. *N Eng J Med* 1984; 311:1.084-1.098.
 13. BAUMGARTNER HR. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi. *Microvasc Res* 1973; 5:167-179.
 14. BAUMGARTNER HR, MUGGLI R. Adhesion and aggregation: morphological demonstration and quantitation in vivo and in vitro. En: Gordon JL, ed. *Platelets in Biology and Pathology*. Amsterdam, Elsevier, 1976; 23-60.
 15. BAUMGARTNER HR. Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with α -chymotrypsin-digested subendothelium. *Thromb Haemost* 1977; 37:1-16.
 16. BAUMGARTNER HR, TSCHOPP TB, MEYER D. Shear rate dependent inhibition of platelet adhesion and aggregation on collagenous surfaces by antibodies to human factor VIII/von Willebrand factor. *Br J Haematol* 1980; 44:127-139.

17. ESCOLAR G, BASTIDA E, CASTILLO R, ORDINAS A. Development of a computer program to analyze the parameters of platelet-vessel wall interaction. *Haemostasis* 1986; 16:8-14.
18. SAKARIASSEN KS, AARTS PAMM, DE GROOT PG, HOUDIJK WPM, SIXMA JJ. A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix and purified components. *J Lab Clin Med* 1983; 102: 522-535.
19. HOUDIJK WPM, SAKARIASSEN KS, NIEVELSTEIN PFEM, SIXMA JJ. Role of factor VIII-von Willebrand factor and fibronectin in the interaction of platelets in flowing blood with monomeric and fibrillar human collagen types I and III. *J Clin Invest* 1985; 75:531.
20. HOUDIJK WPM, SIXMA JJ. Fibronectin in artery subendothelium is important for platelet adhesion. *Blood* 1985; 65:598.
21. SAKARIASSEN KS, NIEVELSTEIN PFEM, COLLER BS, SIXMA JJ. The role of platelet membrane glycoprotein Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium. *Br J Haematol* (en prensa).
22. WEISS HJ, TURITTO VT, BAUMGARTNER HR. Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in glycoproteins IIb-IIIa, Ib and storage granules. *Thromb Haemost* 1985; 54:50.
23. TURITTO VT, WEISS HJ, BAUMGARTNER HR. Decreased platelet adhesion on vessel segments in von Willebrand's disease: a defect in initial platelet attachment. *J Lab Clin Med* 1983; 102:551.
24. MARCUM JM, MCGILL M, BASTIDA E, ORDINAS A, JAMIESON GA. The interaction of platelets, tumor cells and vascular subendothelium. *J Lab Clin Med* 1980; 96:1.046-1.051.
25. BASTIDA E, ESCOLAR G, ALMIRALL L, ORDINAS A. Platelet activation induced by a human neuroblastoma tumor cell lines is reduced by prior administration of ticlopidine. *Thromb Haemost* 1986 (en prensa).
26. STEL HV, SAKARIASSEN KS, SCHOLTE BJ et al. Characterization of 25 monoclonal antibodies to factor VIII-von Willebrand factor: relationship between ristocetin-induced platelet aggregation and platelet adherence to subendothelium *Blood* 1984; 63: 1.408-1.415.

DISCUSIÓN

J. COSIN: Quería hacer un comentario de orden práctico en relación con las plaquetas. Existe en cardiología un creciente interés por la fisiología de la activación y la agregación plaquetar y su influencia en la oclusión vascular, no sólo la aguda por espasmo o por liberación de sustancias vasoactivas, sino en la crónica por aterosclerosis. De modo tradicional se administran antiagregantes en aquellas situaciones donde se sospecha que las plaquetas puedan estar activadas, por ejemplo en los pacientes con antecedentes de infarto agudo de miocardio. Esta terapéutica se administra muchas veces de forma empírica, ya que no parece existir una prueba *in vivo* que permita saber en primer lugar qué pacientes deben recibir antiagregantes y en segundo lugar qué fármacos son útiles en cada tipo de pacientes para lograr el efecto terapéutico adecuado. En consecuencia, da la impresión de que seguimos una serie de modas a la espera de una recomendación definitiva.

A. ORDINAS: Estoy totalmente de acuerdo, pero conviene tener en cuenta que nos enfrentamos a una enfermedad multifactorial que es la aterosclerosis. No se puede enfocar el problema del infarto agudo de miocardio simplemente intentando ajustar la dosis de un nuevo antiagregante mediante una prueba que sirva de orientación para administrar 500 mg

o 150 mg de ácido acetilsalicílico, diariamente o a días alternos, efervescentes o no. Los últimos estudios sobre la permeabilidad del *bypass* aortocoronario sugieren que el ácido acetilsalicílico asociado a dipiridamol es la terapia más adecuada. Sin embargo, es posible que sea la más adecuada para la prevención de la oclusión del *bypass*, pero no para la prevención de la claudicación intermitente. Opino que actualmente es imposible sentar unas recomendaciones rígidas, por lo que cada cual debe actuar de acuerdo con su propio criterio y su experiencia, ya que extrapolar las conclusiones de unos ensayos clínicos multicéntricos a los casos concretos de cada uno no es tan sencillo. Además, aparte de las plaquetas intervienen otros muchos factores.

J. COSIN: La cuestión es que la agregación plaquetaria, uno de los aspectos importantes del problema multifactorial, es algo que de modo crónico se nos escapa y al parecer se nos va a seguir escapando.

A. ORDINAS: Lamentablemente, creo que efectivamente así es.

F.J. GONZÁLEZ DE DIOS: En relación con la pregunta anterior y con respecto al ácido acetilsalicílico, ¿tiene algo que ver la diferencia de dosis? ¿Podría usted comentar este «diálogo» que se dice que existe entre la plaqueta y la pared vascular?

A. ORDINAS: Hace ya algún tiempo, al profundizar en el estudio del metabolismo de las prostaglandinas se comprobó que el producto final del mismo en la plaqueta era el tromboxano, que es un potente vasoconstrictor y además es proagregante plaquetario. Por el contrario, a nivel endotelial el metabolismo de las prostaglandinas es similar al de las plaquetas, pero el producto final en lugar de ser el tromboxano es la prostaciclina.

La prostaciclina es el antiagregante más potente que se conoce y además es un vasodilatador. Tanto el tromboxano como la prostaciclina proceden del ácido araquidónico a través de la vía de la ciclooxigenasa, y el ácido acetilsalicílico bloquea esta enzima, con lo cual se interrumpe la síntesis de tromboxano que es nocivo porque es proagregante, pero también se bloquea la síntesis de la prostaciclina que es antiagregante. Y de aquí surge el dilema de qué dosis de ácido acetilsalicílico administrar para intentar bloquear una vía sin afectar a la otra, aunque en realidad este dilema es teórico, ya que en la plaqueta, dado que la misma carece de capacidad de síntesis de nuevas proteínas, el efecto del ácido acetilsalicílico es irreversible, mientras que en la célula endotelial el efecto se reversibiliza a las pocas horas por su capacidad de producir nuevos enzimas.

C. SERRANO: En primer lugar, me ha llamado la atención el hecho de que el hematócrito influya sobre la agregación de las plaquetas y la adherencia de éstas a la pared vascular. En este contexto mi pregunta se refiere a en qué forma el hematócrito influye sobre esta adherencia, y en segundo lugar, quisiera preguntar si los pacientes con hematócrito elevado tienen tendencia a una mayor agregabilidad y serían por tanto candidatos a un tratamiento con antiagregantes plaquetarios. Es decir, si independientemente de su mayor propensión a la trombosis por hiperviscosidad también serían candidatos a tratamiento antiagregante a efectos de influir sobre las plaquetas.

A. ORDINAS: La respuesta a la primera pregunta se basa simplemente en principios físicos. Es decir, las partículas de mayor tamaño que son los hematíes ocupan la parte central del flujo circulatorio y empujan a partículas más pequeñas, como las plaquetas, contra las paredes. Si hay pocos hematíes, las plaque-

tas circularán más por el centro, y su interacción con la pared vascular será menor.

En cuanto a la segunda cuestión, se han intentado iniciar algunos ensayos multicéntricos en pacientes con patologías tales como la hemocromatosis, que cursan con un aumento del número de hematíes. Pero curiosamente, en estos pacientes no se sabe exactamente por qué razón coincide un trombotopatía, es decir, sus plaquetas están funcionalmente alteradas. Por eso no se han continuado los estudios de antiagregación plaquetaria en dichas situaciones, que cursan con hematócrito elevado.

J.V. CASTELL: Quisiera preguntar al Dr. Ordinas si en ausencia de fibronectina tiene lugar la agregación plaquetaria *in vitro*.

A. ORDINAS: Está disminuida en mayor o menor grado, dependiendo del agente agregante utilizado. Los conocimientos que hemos adquirido sobre el papel de las glucoproteínas de membrana son gracias a que existe una patología congénita que cursa con ausencia de alguno de estos receptores. Sabemos que la glucoproteína I es muy importante para la adhesión plaquetaria, porque en una enfermedad congénita como es el síndrome de Bernard-Soulier no existe esta glucoproteína, y hay una alteración de la adhesión plaquetaria. Conocemos también el papel del factor von Willebrand cuyo déficit cursa con una prolongación del tiempo de sangría, entre otros ejemplos. Sin embargo, el déficit congénito de fibronectina no existe porque es incompatible con la vida; la fibronectina es importante no tan sólo para la hemostasia sino también para multitud de procesos.

J.V. CASTELL: Ahora bien, existen situaciones patológicas en las cuales los niveles de fibronectina son bajos. ¿De alguna forma han tenido experiencia o conocen situaciones en las cuales la fibronectina esté baja y ello se traduzca en una disminución de la agregación plaquetaria, *in vivo* en este caso?

A. ORDINAS: No, porque aunque en determinadas situaciones se han podido demostrar antigénicamente unos niveles bajos de fibronectina en plasma, la fibronectina que se libera de otros elementos celulares, independientemente del déficit plasmático, compensa el defecto, con lo cual no aparecen manifestaciones clínicas.

Pancreatitis aguda experimental

M. Pérez-Mateo y N. Vázquez

Departamento de Medicina. Universidad de Alicante. Hospital General de Elche, INSALUD. Elche. Alicante.

Introducción

La pancreatitis aguda es una enfermedad frecuente en el área de influencia de nuestro hospital. Durante los 9 años transcurridos desde su apertura, esta enfermedad ha supuesto aproximadamente el 18-20 % de los ingresos de la Unidad de Gastroenterología. De manera aproximada, estas cifras suponen una incidencia 4 veces superior a la comunicada por Gatell et al¹ en el área de Barcelona.

Sin duda, esta elevada frecuencia de la enfermedad ha provocado un especial interés por esta entidad en nuestro grupo de trabajo. Fruto de ello han sido diversas publicaciones y trabajos clínicos, de los que es de destacar un estudio doble ciego sobre la eficacia de cimetidina en pancreatitis aguda².

En la actualidad, el tratamiento de la pancreatitis aguda se basa en medidas sintomáticas y mantenimiento del estado general, sin que se haya probado que ningún tratamiento, teóricamente específico, sea de utilidad. Por ello, la investigación de nuevos tratamientos de una entidad potencialmente mortal, sigue siendo objeto de trabajo de numerosos grupos. Por nuestra parte, hemos pretendido incorporar a ese esfuerzo con el desarrollo de investigación básica en este campo, así como con el ensayo de nuevas terapéuticas con potencial utilidad clínica.

Modelos experimentales de pancreatitis aguda

Los modelos experimentales de enfermedades clínicas son, en general, lesiones inducidas en animales de laboratorio que se parecen a las que suceden en humanos. El grado de esta semejanza puede variar considerablemente en naturaleza e intensidad. Por ejemplo, los procesos clínicos y experimentales pueden ser similares en términos de agente precipitante, patrón de progresión, biología molecular y fisiopatología, respuesta al tratamiento y/o secuelas. El modelo experimental ideal de una enfermedad debería semejarse a la enfermedad clínica en todos estos hechos, pero tales modelos se consiguen en pocas ocasiones, destacando quizá las enfermedades infecciosas. En otros casos, los investigadores se ven forzados a emplear modelos menos ideales y que se parecen sólo parcialmente al fenómeno clínico. Ello es particularmente cierto para la pancreatitis, una enfermedad de etiología incierta que no desarrollan espontáneamente los animales de experimentación.

Se han desarrollado varios modelos experimentales de pancreatitis (tabla I)³, divididos arbitrariamente en aquellos que requieren una intervención quirúrgica y los inducidos por métodos no invasivos. Hace algunos años, los es-

TABLA I
MODELOS EXPERIMENTALES DE PANCREATITIS

Modelos invasivos
Inyección ductal retrógrada
Inyección intraparenquimatosa
Asa duodenal cerrada
Ligadura del ducto con estímulo de secreción
Modelos no invasivos
Insecticidas anticolinesterásicos
Dosis hiperestimulantes de secretagogos
Dieta deficiente en colina y con suplemento de etionina

Tomada de Steer y Meldolesi, 1984.

TABLA II
RESULTADOS EN RATAS CONTROL Y CON ASA DUODENAL CERRADA

	<i>n</i>	<i>Pancreatitis</i>	<i>Supervivencia</i>	<i>Ascitis</i>	<i>Perforación</i>
Primer grupo	12	0	12	0	0
Segundo grupo	5	0	5	2	1
Tercer grupo	5	5	5	4	2
Cuarto grupo	5	5	0	5	4

TABLA III
AMILASEMIA Y CREATININEMIA EN RATAS CONTROL
Y CON LIGADURA DEL CONDUCTO PANCREÁTICO

	<i>Amilasemia (U/ml)*</i>	<i>Creatininemia (mmol/l)*</i>
Control	3.845 ± 481	26,25 ± 11,29
Ligadura	44.450 ± 8.653	22,20 ± 7,08

* \bar{X} ± DE.

tudiosos del tema estaban de acuerdo en que la enfermedad resulta del reflujo de bilis y/o jugo duodenal en el conducto pancreático y, a continuación, en el parénquima pancreático. Como consecuencia, se diseñaron modelos que mimetizaban este proceso, inyectando bajo distintas presiones diversos agentes en el conducto pancreático o en el propio parénquima. Algunos de estos agentes utilizados han sido sales biliares, sangre, jugo duodenal y enzimas pancreáticas activadas. La creación de un asa duodenal cerrada⁴ se ha utilizado también con el objetivo de inducir reflujo pancreático; en este último caso, la pancreatitis puede reflejar el desarrollo de isquemia pancreática como resultado del compromiso de la vascularización.

Sin embargo, la mayoría de estas formas invasivas de pancreatitis experimental son de difícil control y se caracterizan por destrucción rápida y masiva de la glándula. Estos hechos han obstaculizado las investigaciones para conocer la fisiopatología y evolución de la pancreatitis aguda y han complicado los trabajos diseñados para ensayar nuevos tratamientos⁵. Para obviar estos problemas, en la última década se han desarrollado 2 nuevos modelos experimentales, no invasivos, más fácilmente controlables, como son la hiperestimulación con dosis altas de secretagogos⁶ y la alimentación con dieta deficiente en colina y suplementada con etionina. Usando estos dos modelos, se ha podido estudiar la síntesis, transporte intracelular y secreción de enzimas digestivas en la célula acinar durante las fases precoces de la enfermedad⁸.

En la pancreatitis inducida por dieta, se bloquea la exocitosis, acumulándose las enzimas

digestivas y gránulos de cimógeno. Éstos se funden con los lisosomas (crinofagia), originando amplias vacuolas que contienen hidrolasas y cimógenos digestivos. Este modelo produce una pancreatitis necrohemorrágica. En la pancreatitis inducida por secretagogo, la separación de enzimas lisosomales y las enzimas digestivas son segregadas juntas, formando vacuolas inmaduras que contienen ambas. Con este modelo se produce una forma edematosa no letal. Estos hechos pueden explicar el mecanismo por el que se pueden activar precozmente las enzimas digestivas intracelularmente y producir eventualmente la lesión celular, a diferencia de lo clásicamente aceptado.

Resultados con diversos modelos experimentales

Datos previos

El desarrollo de nuestras experiencias en pancreatitis aguda se ha fundamentado parcialmente en los trabajos del Departamento de Cirugía de la Universidad de Alicante⁹, con el que colaboramos y que amablemente nos cedió sus instalaciones para realizar nuestro estudio. Dichos trabajos previos se realizaron con el objetivo de conocer detalladamente cada modelo experimental. Para ello, se tomaron 54 ratas Wistar (250-300 g) separadas en 3 grupos de 18 ratas cada uno, adjudicándolos a modelos distintos. A su vez, cada grupo fue subdividido en otros tres, a fin de observar la evolución a las 4,8 y 12 horas. Los animales fueron anestesiados con

pentotal intraperitoneal. También se les practicó venotomía de la vena yugular externa a todos ellos para perfusión intravenosa continua.

Primer grupo: ligadura de colédoco. Tras realizar laparotomía media, se expuso el duodeno, ligándose el conducto biliar en el punto de entrada en el duodeno.

Segundo grupo: ligadura doble duodenal. Se realiza con doble ligadura distal y proximal al colédoco; posteriormente se inyectan 0,4 ml de taurocolato sódico al 2 %.

Tercer grupo: infusión de colecistocinina. Se administró por vía intravenosa, a razón de 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, durante 4,8 y 12 horas.

En los 3 modelos se tomaron muestras iniciales y finales de sangre, orina, líquido ascítico y pleural, determinando amilasa, lipasa y creatinina. Se realizó estudio anatomopatológico a todos los animales. De manera sintética, los hallazgos biológicos más destacables fueron los siguientes: amilasemia: máxima elevación entre las 4 y 8 horas para los dos primeros modelos y pendiente todavía en ascenso a las 12 horas para el tercero. Lipasemia: máxima elevación a las 4 horas para los dos primeros modelos, junto a la elevación constante, similar a la amilasemia, en las pancreatitis inducidas por CCK. Amilasa y lipasa en líquido ascítico y pleural: de una manera global, siguen las alteraciones enzimáticas plasmáticas.

Desde el punto de vista morfológico, en los dos primeros modelos se observan zonas de necrosis grasa y hemorrágicas, con el retroperitoneo claramente edematoso. En este grupo se observó gran producción de líquido ascítico y aparición de esteatonecrosis, así como perforación intestinal, que llegó hasta el 22 % del segundo grupo. En las pancreatitis inducidas mediante la infusión de CCK, lo único evidenciable fue el edema, localizado en la cola del páncreas.

Las conclusiones más destacables de este estudio son las siguientes: a) todos los modelos estudiados inducen pancreatitis aguda; b) la severidad de las lesiones no se corresponde con la intensidad de las alteraciones analíticas; c) existe una correlación entre las variaciones analíticas y tiempo de evolución de cada modelo, y d) cada modelo presenta una alteración morfológica diferente.

Segunda serie

Con estos resultados, decidimos comprobar la adecuación de los modelos experimentales

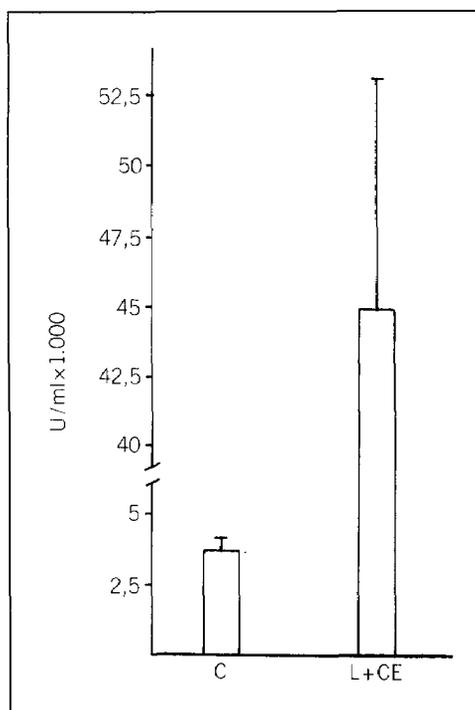


Fig. 1. Niveles plasmáticos medios \pm DE de amilasa en ratas control (C) y con ligadura de conducto pancreático más ceruleína (L+CE).

referidos para el desarrollo de nuestras investigaciones terapéuticas.

Para ello, se tomaron 27 ratas Wistar machos, de 250-300 g de peso, divididos en 4 grupos. Todos ellos fueron anestesiados con pentotal a razón de 40 mg/kg por vía intraperitoneal. Los resultados se resumen en la tabla II.

Primer grupo: Se realizó solamente una laparotomía y cierre de la misma, componiendo el grupo de control con intervención simulada. Todos los animales vivían a las 24 horas, momento en que fueron sacrificados. Se extrajo el páncreas, comprobándose su normalidad macro y microscópica. En este grupo de control se realizaron, además, las siguientes determinaciones: Amilasemia: método enzimático, con sustrato de dextrina. Creatinina en plasma: método colorimétrico de Jaffé. Los resultados se muestran en la tabla III y figura 1.

Segundo grupo: Se practicó asa duodenal cerrada, según se ha descrito. Se sacrificaron a

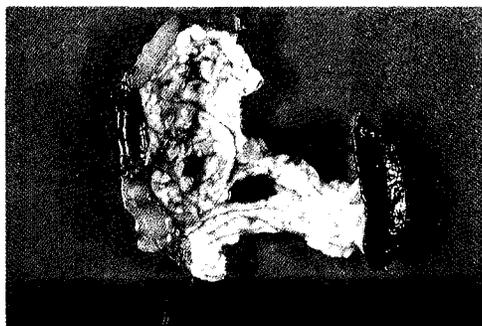


Fig. 2. Doble ligadura duodenal y pancreatitis necrohemorrágica.

las 24 horas. Dos ratas habían desarrollado ascitis pero no pancreatitis.

Tercer grupo: Se realizó asa duodenal cerrada y se estimuló el páncreas con ceruleína (1 ng/g por vía intraperitoneal). La ceruleína se disolvió en seroalbúmina bovina y suero fisiológico. Se sacrificaron a las 24 horas y todos presentaban pancreatitis aguda.

Cuarto grupo: Igual al anterior, más inyección de 2 ml de agua destilada intraduodenal. Todos los animales fallecieron antes de las 24 horas y todos desarrollaron pancreatitis aguda severa necrohemorrágica (fig. 2 y 3).

Es de destacar el alto porcentaje de perforaciones duodenales con peritonitis secundaria en esta serie. Ello plantea el problema de que las repercusiones en el animal no se deban sólo a pancreatitis, sino a la necrosis intestinal y posible peritonitis posterior, como ya habían criticado algunos autores⁵, lo que indujo a la búsqueda de un modelo más adecuado.

Elección de un modelo idóneo

En nuestro ambiente, la litiasis biliar es el factor etiológico más frecuentemente asociado a pancreatitis aguda. Conforme ha mejorado la metodología diagnóstica hemos podido comprobar que gran parte de las pancreatitis agudas previamente catalogadas como idiopáticas son de etiología biliar¹⁰. Un número notable de estudios, particularmente los de Acosta y Ledesma¹¹, han mostrado que las crisis de pancreatitis biliar suceden cuando los cálculos se impactan en el conducto biliar terminal o pasan al duodeno a través del esfínter de Oddi. Como consecuencia de ello, se acepta que la

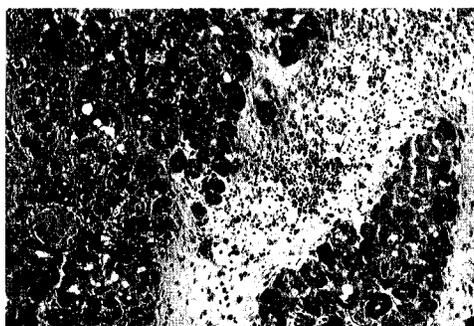


Fig. 3. Microfotografía de un septo pancreático edematoso y con focos hemorrágicos.

pancreatitis biliar se produce por hipertensión en el conducto pancreático debida a la obstrucción y secreción pancreática mantenida. La ligadura del conducto pancreático junto con estimulación de la secreción, un modelo experimental curiosamente poco utilizado hasta el momento, reproduce con bastante similitud esta secuencia de hechos³. Además, podría especularse que la hipertensión ductal impidiera la exocitosis de los gránulos de zimógeno, produciéndose un contacto con las enzimas lisosomales y activación intracelular de aquellos, como se demostró con los modelos no invasivos³.

La reproducción y caracterización de este modelo en nuestro medio se realizó de la siguiente forma: tras una preparación semejante a la previamente descrita, se procedió a la ligadura del conducto pancreático y estimulación con ceruleína por vía intraperitoneal a dosis de 1 ng/g, según se ha especificado en grupos anteriores. Se intervinieron 15 animales, divididos en 2 grupos (tabla IV):

Primer grupo: Compuesto por 5 ratas. Los 5 animales supervivieron a las 24 horas. Todos presentaban pancreatitis macro y microscópica. Las cifras medias de amilasemia y creatininemia se muestran en la tabla III y figura 1.

Segundo grupo: Compuesto por 10 ratas. A las 48 horas sólo sobrevivían 2 animales, aunque en todos existía pancreatitis severa (fig. 4). La amilasemia de los 2 supervivientes eran llamativamente normal.

Los principales hallazgos histológicos en este grupo de animales es el edema, necrosis acinar, infiltración inflamatoria, focos hemorrágicos y necrosis de las grasa peripancreática (fig. 5).

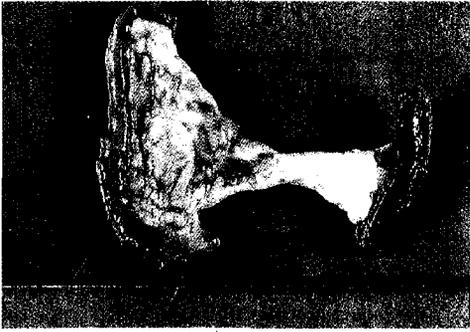


Fig. 4. Ligadura del conducto y pancreatitis aguda severa.

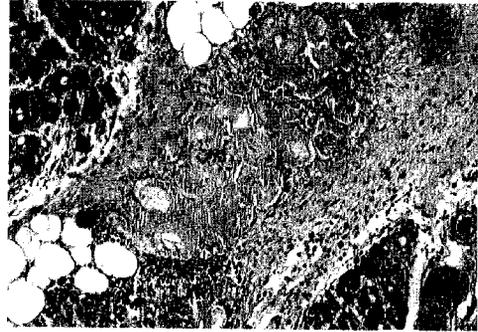


Fig. 5. Necrosis enzimática con destrucción acinar.

Estos hechos son superponibles a los encontrados en la pancreatitis aguda humana.

En conjunto, pensamos que la ligadura del conducto pancreático junto con estimulación con ceruleína es el modelo que semeja más estrechamente a la pancreatitis aguda biliar humana y, por lo tanto, es el que pensamos adoptar para futuros estudios.

Estudios en curso

Objetivo

Hemos comenzado un estudio sobre la efectividad de una sustancia (gabexato mesilato, FOY) con potente actividad antiproteásica, en el tratamiento de la pancreatitis aguda.

Antecedentes

Distintos inhibidores de las proteasas se han ensayado experimentalmente en pancreatitis aguda, a menudo con buenos resultados¹². Sólo unos cuantos se han probado en humanos. El más conocido de ellos, la aprotinina (PM 7.000), tras unos resultados iniciales muy prometedores, tanto experimentales como en clínica^{13,14}, cayó en desuso a causa de la negati-

vidad de varios ensayos bien controlados^{15,16}. No obstante, dado que la autodigestión pancreática sigue siendo aceptada como mecanismo lesional en la pancreatitis aguda, algunos autores insisten en la posible efectividad de las sustancias antiproteásicas, recomendando que se investigue su eficacia usadas precozmente y en dosis masivas^{13,17}. El FOY es otro inhibidor de las proteasas de peso molecular más bajo (PM 417). Tiene actividad antikaliceína, antitripsina y antiplasmina¹⁸. También tiene efectos antifosfolipasa A₂, comprobándose experimentalmente que reduce la producción de lisolecitina¹⁹. Su diferencia con la aprotinina estribaría en que, gracias a su menor peso molecular, podría actuar intracelularmente, lo cual es muy interesante a la vista de la secuencia de activación enzimática en las fases precoces de la pancreatitis aguda, como se vio con los modelos no invasivos. Los resultados iniciales experimentales²⁰ y clínicos²¹ son alentadores.

Diseño del estudio

Además de un ensayo clínico en humanos, se ha programado un estudio experimental en ratas con FOY de la siguiente forma.

TABLA IV
RESULTADOS EN RATAS CON LIGADURA DEL CONDUCTO PANCREÁTICO
Y ESTIMULACIÓN CON CERULEÍNA

	<i>n</i>	Presencia de pancreatitis	Supervivencia
Grupo 24 h	5	5	5
Grupo 48 h	10	10	2

Primer grupo: A 20 ratas se les produce pancreatitis con ligadura del conducto pancreático y estimulación con ceruleína 1 ng/g. Se canulará la vena yugular externa y se perfundirá suero salino 1 ml/kg/h.

Segundo grupo: A su vez, dividido en 4 subgrupos de 20 ratas cada uno. Se provocará en todos ellos pancreatitis aguda como en el grupo anterior. Estos animales recibirán FOY a razón de 5 mg/kg/min durante 6 horas, comenzando dicha administración en las 0, 6, 12 y 18 horas posteriores a la intervención. Dentro de cada subgrupo, el 50 % será examinado a las 24 horas y el resto a las 48 horas.

Parámetros que se van a valorar

1. Observación del efecto del FOY sobre la supervivencia en los momentos estimados.
2. Determinación del hematocrito, creatinemia y amilaseemia en todos los animales.
3. Examen microscópico del páncreas, con valoración del tipo y grado de lesión pancreática.

BIBLIOGRAFÍA

1. GATELL JM, GALINDO F, CAMP J, MILLA J. Pancreatitis aguda en el área de Barcelona. *Gastroenterol Hepatol* 1979; 2:136-140.
2. SILLERO C, PÉREZ-MATEO M, VÁZQUEZ N, MARTÍN HIDALGO A. Controlled trial of cimetidine in acute pancreatitis. *Eur J Clin Pharmacol* 1981; 21:17-21.
3. STEER ML, MELDOLESI J. Experimental acute pancreatitis: Relevance of models to clinical disease. En: Gyr KE, Singer MV, Sarles H, eds. *Pancreatitis: Concepts and classification*. Amsterdam. Elsevier Science Publ. 1984; 137-141.
4. NEVALAINEN TJ, SEPPA A. Acute pancreatitis by closed duodenal loop in the rat. *Scand J Gastroent* 1975; 10:521-527.
5. STEER ML. Workshop on experimental pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1985; 30:575-581.
6. LAMPEL M, KERN HF. Acute pancreatitis in the rat induced by excessive doses of pancreatic secretagogue. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1977; 373:97-117.
7. LOMBARDI B, ESTES LW, LONGNECKER DS. Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-1 deficient diet. *Am J Pathol* 1975; 79:465-480.
8. STEER ML, MELDOLESI J. The cell biology of experimental pancreatitis. *N Eng J Med* 1987; 316:144-150.
9. GONZÁLEZ J, DíEZ M, MEDRANO J, PARDO JM. Pancreatitis agudas experimentales. V Minicongreso de Patología y Terapéutica. Universidad de Alicante, 1987; 73-74.
10. BERBEGAL J, LEYN F, PÉREZ-MATEO M, SILLERO C, VÁZQUEZ N. Estudio comparativo de la pancreatitis aguda e ictericia obstructiva en los bienes 1978-80 y 1983-84. Consideraciones sobre la etiología y el diagnóstico. V Reunión Nacional de Cirugía. Asociación Española de Cirujanos. Alicante, noviembre 1985.
11. ACOSTA JM, LEDESMA CL. Gallstone migration as a cause of acute pancreatitis. *N Eng J Med* 1974; 290:484-487.
12. LOMBARDI B, RAO KN. Acute hemorrhagic pancreatic necrosis in mice. *Digestion* 1982; 23:57-64.
13. IMRIE CW, MACKENZIE M. Effective aprotinin therapy in canine experimental bile-trypsin pancreatitis. *Digestion* 1981; 22:32-38.
14. TRAPNELL JE, RIGBY CC, TALBOT CH, DUNCAN EHL. A controlled trial of Trasylol in the treatment of acute pancreatitis. *Br J Surg* 1974; 61:177-182.
15. MCR multicentre trial of glucagon and aprotinin. Death from acute pancreatitis. *Lancet* 1977; 2:632-635.
16. Medical Research Council Multicentre Trial. Morbidity of acute pancreatitis: The effect of aprotinin and glucagon. *Gut* 1980; 21:334-339.
17. FRITZ H, WUNDERER G. Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneimittel Forsch* 1983; 33:479-494.
18. SAITOH Y. Review of clinical results with gabexate mesilate (FOY) in Japan. En: Grozinger KH, Schrey A, Wabnitz RW, eds. *Proteinaseinhibition*. Duselldorf, Workshop, 1981; 108-122.
19. KAHLE M, KONING W. Lysolecithin production during acute pancreatitis. Can it be influenced by phospholipase A₂-inhibitors? *American Pancreatic Association (36-A 16)*. Chicago, 1985.
20. LANKISCH PG, POHL V, OTTO J, GOKE B. Therapeutic effects of camostatate (FOY 305) on acute experimental pancreatitis. XVIIIth Meeting European Pancreatic Club, Manchester 1985.
21. FREISE J, MELZER P, HORBACH L. Gabexate mesilate in the treatment of acute pancreatitis. Results of the Hannover multicenter double-blind trial with 50 patients. *Dig Dis Sci* 1986; 31 (supl):255.

DISCUSIÓN

F. ALAMILLOS: Yo quería preguntar si la simple administración de ceruleína sin necesidad de

ligar el colédoco con el asa duodenal puede inducir la pancreatitis.

- M. PÉREZ MATEO: Sí, de igual modo que la colecistocinina. Es decir, la ceruleína y la colecistocinina se utilizan indistintamente como estimulantes pancreáticos a dosis elevadas y son capaces de inducir pancreatitis. Lo que ocurre es que la utilización de dosis hiperestimulantes de secretagogos produce una lesión relativamente leve, tan sólo una pancreatitis edematosa que hasta cierto punto resulta poco rentable de cara a la valoración de las pancreatitis graves, que son las que extrapolarando a la práctica clínica realmente nos preocupan.
- F. ALMILLOS: ¿Cuál es la vía de administración de la ceruleína?
- M. PÉREZ MATEO: Se puede administrar por vía intravenosa o por vía intraperitoneal. En el presente estudio se administró vía intraperitoneal.
- S. ERILL: Quería decir al Dr. Pérez Mateo que comentara lo que representa su trabajo experimental con respecto a la observación clínica relativa al escaso valor predictivo de la amilasemia.
- M. PÉREZ MATEO: Efectivamente, desde hace tiempo nos había llamado la atención en clínica la ausencia de una relación entre la gravedad de la enfermedad y la amilasemia al ingreso, así como el hecho de que una rápida disminución de los valores de amilasemia no tuviera necesariamente una implicación pronóstica positiva. Estos criterios se utilizan en muchos estudios clínicos para apoyar la efectividad de diversos tratamientos, cuando realmente esto no es así. De hecho, como ha podido apreciarse en la presentación, las pancreatitis más leves, las inducidas por colecistocinina son las que cursaron con unas alteraciones biológicas más llamativas que no obligatoriamente se corresponden con alteraciones morfológicas muy severas.
- J.M. LÓPEZ VEGA: Si la amilasemia que es un factor fácilmente valorable, no es un buen índice por sí misma ¿han encontrado ustedes en su modelo experimental algún otro factor fácilmente medible que permita predecir la posible evolución de la pancreatitis?
- M. PÉREZ MATEO: Como usted muy bien sabe, en la práctica clínica se utilizan una serie de criterios de gravedad de la pancreatitis aguda, tanto en el momento del ingreso como a las 48 horas de evolución. Sólo quisiera señalar que entre estos criterios no se incluye la amilasemia.
- J.M. LÓPEZ VEGA: Por supuesto, pero yo me refería más que a los criterios de utilización clínica a si han observado algún factor asociado por sí mismo a mal pronóstico en su modelo experimental.
- M. PÉREZ MATEO: La técnica utilizada tiene lógicamente una gran influencia, concretamente la ligadura con estimulación se asocia a una mortalidad de casi el 80 % de los animales a las 48 horas.
- J.M. LÓPEZ VEGA: Una de las medidas terapéuticas habituales en la clínica es la aspiración gástrica a efectos de mantener el páncreas en reposo. Me gustaría conocer su opinión sobre esta práctica y las posibles alternativas a la misma.
- M. PÉREZ MATEO: En estudios bien controlados se ha demostrado que la aspiración nasogástrica no aporta ventajas adicionales a la dieta absoluta en la pancreatitis aguda en humanos aunque sea una práctica clínica rutinaria en la mayoría de centros. En nuestro modelo experimental, inyectamos agua a efectos de valorar si la presión dentro del asa duodenal aumentaba la gravedad de la enfermedad y realmente así fue. Ello sugiere que no es solamente la calidad del líquido sino también la presión existente en el asa duodenal en ese modelo experimental la que agrava el pronóstico.
- G. VÁZQUEZ: ¿Ha podido usted comprobar cuál es el mecanismo de muerte en estos animales?
- M. PÉREZ MATEO: No, el mecanismo de muerte no.
- G. VÁZQUEZ: Es difícil especular pero ¿podrían haber fallecido por hipovolemia en presencia de un tercer espacio?
- M. PÉREZ MATEO: No me atrevo a pronunciarlo. Esto es difícil de comprobar.

Substitución protésica de las cuerdas tendinosas de la válvula mitral

J.M. Revuelta y L. Gaité*

Hospital Nacional Marqués de Valdecilla. Universidad de Cantabria. Santander.

Resumen

La insuficiencia mitral severa debida a elongación o rotura de cuerdas tendinosas de la válvula mitral puede ser reparada con éxito cuando la patología afecta a la valva posterior. Sin embargo, la afectación de las cuerdas de la valva anterior se considera indicación de recambio valvular debido a los resultados postoperatorios insatisfactorios.

En este trabajo se presenta una técnica quirúrgica original, simple y reproducible de substitución protésica de las cuerdas principales de la mitral. Se ha utilizado como material protésico el politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE) ya que se trata de un material inerte, poco trombogénico y estable a largo plazo.

Se ha implantado en 30 ovejas jóvenes substituyendo las cuerdas principales de la valva anterior. Sobrevivieron a la cirugía 25 animales que fueron estudiados desde el punto de vista clínico, hemodinámico y anatomopatológico.

Los resultados obtenidos demuestran que este método de cirugía conservadora es estable a largo plazo y permite reconstruir las cuerdas tendinosas afectadas.

Introducción

La cirugía reconstructora de la válvula mitral suele enfrentarse con una serie de inconvenientes de índole anatómico, particularmente cuando existen anomalías de las cuerdas tendinosas.

La existencia de una elongación significativa o rotura de las cuerdas tendinosas principales de la válvula mitral puede solucionarse, en determinadas ocasiones, mediante técnicas conservadoras. La cirugía de reparación de cuer-

das tendinosas más aceptada mundialmente es la descrita por Carpentier¹. Esta técnica consiste esencialmente en corregir el prolapso de la valva afectada mediante una resección extensa del tejido valvular. Cuando la cuerda tendinosa rota o elongada pertenece a la valva posterior, los resultados suelen ser muy satisfactorios². Por el contrario, la patología de cuerdas correspondiente a la valva anterior se considera actualmente indicación de recambio valvular por los malos resultados postoperatorios³.

En este estudio experimental se analizan los resultados postoperatorios tardíos obtenidos tras la substitución de las cuerdas tendinosas principales de la valva anterior de la mitral en la oveja. Se describe una técnica quirúrgica original y sencilla para la substitución protésica de estas cuerdas.

Material y métodos

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron 30 ovejas jóvenes con un peso medio de $22,3 \pm 2,7$ kg.

Para la substitución de las cuerdas tendinosas principales o marginales de la válvula mitral se utilizó una nueva sutura de monofilamento poroso no absorbible que se compone de politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE) (GORE-TEXTM). Esta sutura no produce reacción alérgica ni inflamatoria, ni tampoco se degrada *in vivo* ni es debilitada por las bacterias o las enzimas hísticas⁴. Es un material escasamente trombogénico, habiéndose comprobado *in vitro* que puede resistir hasta tres veces la tensión que normalmente soporta una cuerda tendinosa humana. Las propiedades de este material se basan en la estructura fundamental del e-PTFE. Su molécula consta de dos átomos de carbono unidos por cuatro de flúor que forman una cubierta que protege a los átomos de carbono del ataque de agentes químicos⁵.

*Becado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social.



Fig. 1. Aspecto macroscópico de la válvula mitral 9 meses después de la cirugía. Resulta difícil diferenciar la cuerda protésica de las nativas.

Los animales se mantuvieron en ayunas durante 24 horas antes de la cirugía. La anestesia se llevó a cabo mediante la administración intravenosa de tiopental sódico (2 mg/kg de peso) y respiración controlada con un ventilador mecánico. Se efectuó toracotomía lateral izquierda por cuarto espacio intercostal para exponer el corazón. Se instauró la circulación extracorpórea (CEC) por medio de canulación de la aurícula derecha y la arteria femoral. Durante la CEC el corazón se mantuvo latiendo en normotermia sin utilizar solución cardiopléctica. El abordaje de la válvula mitral se llevó a cabo mediante auriculotomía izquierda amplia con una incisión desde la orejuela izquierda hasta la vena pulmonar izquierda inferior.

Después de seccionar una o dos cuerdas marginales de la valva anterior, se efectuó sustitución protésica de las mismas con sutura de e-PTFE de 2/0 (7 animales) y 3/0 (23 animales). Dicha sutura se pasó a través de la cúspide del músculo papilar anterior, protegida con un pequeño fragmento de teflón para evitar desgarros del papilar. La nueva cuerda se sutura al tejido de la valva anterior comenzando en el borde libre y, tras varios pasos a través de la valva, se alcanza el anillo, donde la sutura se sujeta con otro fragmento de teflón. En este momento el ventrículo izquierdo se rellena de sangre a presión a través de un *vent* colocado en el ápex y conectado a la línea arterial. De esta manera se comprueba la competencia valvular, pues al tener las cuerdas tendinosas principales seccionadas, existirá una insuficiencia mitral severa. Traccionando suavemente de ambos extremos de la sutura de e-PTFE se llegará a corregir dicha insuficiencia valvular. Cuando la válvula a

tensión es totalmente competente, la sutura es anudada. Es preciso fijar la cuerda protésica al borde libre de la valva anterior con dos suturas de polipropileno 5/0 para prevenir el enrollamiento de la valva sobre la sutura.

Una vez completada la reparación valvular se cierra la aurícula y el tórax según la técnica habitual. El tubo torácico de drenaje se extrae tan pronto como esté despierto el animal.

Se efectúa antibioterapia profiláctica con 1 g de cefamandol intramuscular durante 3 días.

Los animales son trasladados al campo tras permanecer 7 días en el laboratorio experimental. Realizan una vida normal, efectuándose reconocimientos periódicos para comprobar la posible aparición de soplos o signos de insuficiencia cardíaca.

Se efectuó un estudio hemodinámico postoperatorio en todos los animales de forma electiva a los 3, 6, 9 y 16 meses después de la cirugía.

Posteriormente fueron sacrificados para estudio macro y microscópico. Se administraron 3 mg/kg de heparina sódica intravenosa antes de extraer la pieza con el objeto de evitar trombos intracardiácos *post mortem*.

Resultados

Dentro de las primeras 48 horas del postoperatorio fallecieron tres ovejas debido a insuficiencia respiratoria y una a causa de neumotórax. Un animal falleció a los 31 días de la cirugía a consecuencia de un accidente en la granja.

En ningún caso se encontraron signos de insuficiencia cardíaca o tromboembolismo reconocible. Tampoco se observaron signos de insuficiencia mitral severa en esta serie, aunque en una oveja se auscultó un soplo sistólico 1/6 sin repercusión hemodinámica.

El estudio hemodinámico efectuado en todos los animales inmediatamente antes de su sacrificio, demostró la existencia de una presión media de la aurícula izquierda de $7,33 \pm 1,48$ mmHg con ausencia de onda «v» y presión sistólica del ventrículo izquierdo de 105 ± 17 mmHg, con una frecuencia cardíaca media de 92 ppm (82-147 ppm).

Se efectuó sacrificio electivo del animal a los 3 meses (n=5), 6 meses (n=5), 9 meses (n=5) y 18 meses (n=10) después de la cirugía.

El examen macroscópico de las piezas demostró la ausencia de trombos intracavitarios. La válvula mitral tenía un aspecto completamente normal sin signos de endocarditis, trombosis, calcificación o rotura. La valva anterior muestra-

ba una cicatrización completa en los puntos de perforación de la sutura. Ésta estaba incorporada perfectamente en tejido valvular y el músculo papilar. El aparato subvalvular también presentaba una estructura macroscópica normal (fig. 1). No resultó fácil identificar la cuerda protésica, ya que presentaba una apariencia idéntica a las cuerdas nativas. La sutura de e-PTFE mantenía sus características y tamaño originales.

Microscópicamente la válvula mitral presenta una ligera reacción cicatrizal en torno a la cuerda protésica. Esta última aparece recubierta de una capa de tejido colágeno organizado que reproduce prácticamente de manera idéntica la estructura de la cuerda nativa: endotelio de recubrimiento, capa externa de tejido colágeno esponjoso y capa interna de tejido colágeno denso (fig. 2)⁶. En la interfase entre el tejido colágeno y el material de e-PTFE se observó una ligera reacción macrofágica con ocasionales células gigantes. La cuerda protésica permanecía estable sin ser penetrada u organizada por el tejido colágeno.

Comentario

La insuficiencia mitral debida a rotura o elongación de las cuerdas tendinosas constituye una entidad difícil de tratar con técnicas reconstructoras cuando las cuerdas de la valva anterior están afectadas. En 1960 McGoon describió por primera vez la reparación de la insuficiencia mitral debida a rotura de cuerdas mediante plicatura del tejido valvular⁷. Desde entonces, se han descrito diferentes técnicas quirúrgicas para tratar esta patología valvular pero con resultados postoperatorios insatisfactorios. Se ha intentado la sustitución protésica de las cuerdas tendinosas con diversos materiales como seda, teflón, nilón y otros substitutos artificiales⁴, aunque tampoco han tenido éxito.

La utilización de pericardio autólogo o heterólogo para substituir las cuerdas tendinosas ha demostrado ser un material no idóneo debido a los cambios degenerativos que aparecen precozmente⁸.

En esta serie experimental hemos utilizado un nuevo material, el politetrafluoroetileno expandido. La sutura de e-PTFE presenta una microestructura porosa no sujeta a hidrólisis ni degradación química, biocompatible e inerte. Dicha estructura le confiere unas características peculiares, de manera que actúa como los eslabones de una cadena cuando se ejercitan fuerzas laterales sobre la misma. Este hecho le

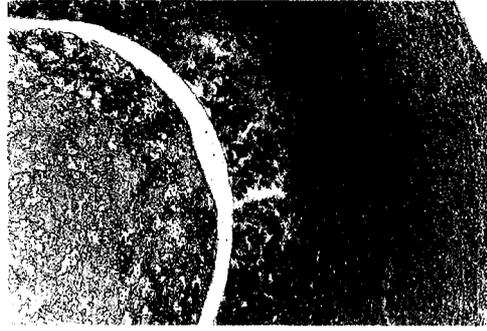


Fig. 2. Sección transversal de la cuerda protésica. A la izquierda se observa la sutura de e-PTFE (Gore-TexTM) recubierta por una capa de tejido colágeno organizado, de características microscópicas idénticas a la cuerda nativa ($\times 500$).



Fig. 3. Ultraestructura de la capa de tejido colágeno de la cuerda protésica. Fibroblasto maduro rodeado de colágeno organizado ($\times 20.000$).

confiere una especial resistencia a la fatiga de flexión y tracción.

Por otro lado, hemos diseñado una técnica quirúrgica muy simple y fácilmente reproducible que evita las complicadas mediciones del aparato subvalvular a las que estaban obligadas las técnicas descritas hasta la actualidad.

Desde 1982 venimos utilizando este excelente material en otros animales de experimentación con resultados muy satisfactorios. Los estudios clínicos y hemodinámicos realizados sugieren que la sutura de e-PTFE es un material estable a largo plazo en la oveja.

La nueva cuerda tendinosa aparece completamente recubierta de un tejido colágeno orga-

nizado 3 meses después de la cirugía. Hemos observado que el grosor de este tejido de recubrimiento no aumenta con el transcurso del tiempo.

La microscopia óptica y electrónica (TEM y SEM) demostró una estructura idéntica de este tejido colágeno de recubrimiento respecto a la estructura de una cuerda nativa (fig. 2 y 3). La nueva sutura de e-PTFE no sólo asumió la función de la cuerda seccionada, sino que fue la matriz de una nueva cuerda biológica, una cuerda tendinosa cultivada.

En conclusión este estudio experimental ha demostrado que la substitución protésica de las cuerdas tendinosas de la válvula mitral, incluso de la valva anterior, es factible y estable a largo plazo. Su aplicación en clínica parece estar justificada en el momento actual.

BIBLIOGRAFÍA

1. CARPENTIER A, RELLAND J, DELOCHE A et al. Conservative management of the prolapsed mitral valve. *Ann Thorac Surg* 1978; 26:294-302.
2. DURAN CG, POMAR JL, REVUELTA JM et al. Conservative operation for mitral insufficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980; 79:326-337.
3. YACOB M, HALINI M, RADLEY-SMITH R, MCKAY R, NIJVELD A, TOWERS M. Surgical treatment of mitral regurgitation caused by floppy valve: repair versus replacement. *Circulation* 1981; 64 (supl 2):210-216.
4. VETTER HO, BURACH JH, FACTOR SM, MACALUSO F, FRATER RWM. Replacement of chordae tendineae of the mitral valve using the new expanded PTFE suture. En: Bodnar E, Yacoub M, eds. *Biologic and bioprosthetic valves*, 1.^a ed. Yorke Medical Books, 1986; 772-785.
5. AGRANOFF J. *Modern plastics encyclopedia*. Nueva York, McGraw Hill, 1979; 56 (10A):26-28 y 469-481.
6. SCOTT-JUPP W, BARNETT NL, GALLAHER PJ, MONRO JL, ROSS JK. Ultrastructural changes in spontaneous ruptured of mitral chordae tendineae. *J Pathol* 1981; 133:185-201.
7. McGOON DC. Repair of mitral insufficiency due to ruptured chordae tendineae. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1960; 39:357-362.
8. SHORE DF, GABBAY S, YELLIN EL, FRATER R. Degenerative changes in glutaraldehyde preserved pericardium used for experimental replacement of anterior chordae of mitral valve. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980; 79:349-357.

DISCUSIÓN

J. COSÍN: Quisiera preguntar cómo podrían seleccionarse en un futuro los pacientes candidatos a una substitución protésica de cuerda tendinosa contando con la ecocardiografía Doppler que probablemente pueda aportar algo en este sentido y qué seguridad se puede tener de que el procedimiento no va a acabar en un recambio valvular. Por otra parte me gustaría conocer también su recomendación actual al plantearse la cirugía mitral en un determinado paciente.

J.M. REVUELTA: Como usted mismo apuntaba, la exploración que hoy día aporta mayor información, más que la propia hemodinámica es la ecocardiografía Doppler. Nosotros tenemos como norma no intervenir a los pacientes mitrales en clase funcional II puesto que siempre se corre el riesgo de tener que acabar con una prótesis valvular, o sea que intentamos siempre intervenir a los pacientes en clase funcional III en adelante. La excepción a esta norma sería un claro caso de cirugía conservadora. Es decir, un paciente joven sin signos de calcificación, con una buena flexibilidad del velo valvular y con poca rigidez del aparato

subvalvular. En pacientes en clase III y IV no hay problema, porque si uno se ve abocado a cambiar la válvula ¿qué más da perder 13 o 14 minutos cuando a veces se pierden simplemente en comentar si debe colocarse tal o cual válvula? Es decir que yo pienso que siempre se debe intentar, y no desesperarse si hay que acabar en prótesis, lo cual ocurre algunas veces.

J. COSÍN: Muchas gracias. Existe otro aspecto que me gustaría que aclarara. Me pregunto si existe la posibilidad como ocurre con otros fenómenos fibrosos del corazón, de que a la larga la cuerda implantada pueda dar lugar a retracción del borde libre de la válvula o incluso llegar a deformarla. ¿Disponen de algún dato experimental sobre esta posibilidad?

J.M. REVUELTA: Esta es una magnífica pregunta que yo no sabía contestar y fue un anatomopatólogo quien me la respondió. Ciertamente existía temor por nuestra parte a que el proceso más o menos organizado pudiera penetrar en el velo valvular, condicionar cierta rigidez y a la larga calcificación del mismo. En realidad, lo que nosotros hacemos con esta

- técnica es introducir un factor iniciador o desencadenante. Filogenéticamente la cuerda tendinosa empieza en la cúspide del músculo papilar y se extiende en dirección al velo valvular. Esto es lo que hemos observado al sacrificar animales muy precozmente después de la intervención. Hemos visto que la cuerda estaba completamente normal y que ha ido creciendo desde papilar en dirección craneal, hasta el punto de que al cabo de algunos meses todavía se encuentra en el borde marginal de la válvula y no existe tejido de neoformación. Desde el punto de vista anatomopatológico es difícil que este tejido específico de cuerda tendinosa invada otras localizaciones. En animales estudiados durante un tiempo equivalente de 15 a 18 años en el hombre no hemos visto ningún caso.
- F. ALAMILLOS: El riesgo de endocarditis posquirúrgica con esta técnica ¿es teóricamente mayor, menor o igual que la sustitución valvular?
- J.M. REVUELTA: Carezco de información previa. En principio se introduce un material extraño, aunque si transcurre un tiempo suficiente para que se recubra habrá que pensar que a partir de este momento las posibilidades de endocarditis son mínimas, pero mientras no esté recubierto yo diría que la situación es parecida a lo que ocurre con cualquier otra prótesis, aunque no dispongo de datos para poderlo confirmar.
- D. ANDREU: Yo pensaba, quizás para acabar de redondear el experimento, si se les ha ocurrido extraer la sutura a modo de guía para comprobar si la cuerda neoformada puede aguantar el esfuerzo mecánico.
- J.M. REVUELTA: En imágenes de microscopía óptica de superficie se observa perfectamente cómo la sutura ocupa la parte central rodeada de este tejido. O sea, que en principio sería factible. El problema reside en que la sutura está enclavada en el papilar y lógicamente en el velo, y yo pienso que este tejido aun siendo hipotéticamente una nueva cuerda tendinosa, debe ser bastante frágil. Además en humanos comportaría el problema y el riesgo adicional de una reintervención para extraer la sutura.
- J. SEGOVIA: En primer lugar quería felicitar al Dr. Revuelta por su brillante trabajo, que me ha parecido francamente emocionante. Me gustaría preguntarle cuáles son a su juicio las implicaciones futuras de esta línea de investigación.
- J.M. REVUELTA: Estamos en fase muy inicial todavía, por lo que conviene ser prudentes. Confío en que dentro de un par de años quizá podamos disponer de resultados preliminares en clínica. De momento es pronto para hacer conjeturas.
- F. GIRVENT: Yo tengo también una pregunta para el Dr. Revuelta después de felicitarle por su excelente trabajo. El material utilizado, ¿se trata de politetrafluoruro de carbono?
- J.M. REVUELTA: Es politetrafluoroetileno expandido, el cual se emplea en prótesis vasculares, y de ahí la experiencia previa con este material que no es trombogénico.
- A. ORDINAS: Creo que existe una amplia experiencia con este material, y se ha comprobado que en medio de cultivo parecido a la técnica que nosotros utilizamos en el cultivo de célula endotelial, se caracteriza por la gran facilidad que tiene de inducir nuevo material vascular de tal forma que en muestras clínicas resulta a veces difícil diferenciar el material sintético del nuevo tejido vascular. Yo creo que ha sido uno de los descubrimientos más importantes en cuanto a material protésico sintético en los últimos años. Sin embargo, curiosamente este material no da buenos resultados cuando se utiliza en *bypass* coronarios.
- J.M. REVUELTA: Es cierto, no ha dado buenos resultados. Nosotros lo hemos utilizado en solamente dos pacientes y no dio resultado; hay además estadísticas a nivel internacional que lo demuestran. Sin embargo, es el único material sintético de que se dispone cuando por una razón u otra no es posible utilizar un pontaje con vena, aunque el porcentaje de oclusión es muy superior.

Perspectivas de la neumología en el paciente crítico

G. Vázquez Mata, J.M. Torres Ruiz y P. Navarrete

Servicio de Medicina Intensiva. Ciudad Sanitaria Virgen de las Nieves. Granada.

La medicina clínica experimenta una revolución científica al haberse creado un cuerpo de doctrina asistencial basado en el método científico de investigación biológica, y por tanto capaz de objetivar el hecho clínico. Esta renovación metodológica se ha desarrollado en las últimas décadas, con un fenómeno de aceleración progresiva, y se ha basado en campos científicos paralelos a la medicina clínica, tales como la bioestadística, epidemiología, bioingeniería, etc. El objetivo del presente trabajo es describir esta metodología a grandes rasgos, aplicada a la neumología, y ésta a su vez desarrollada en un servicio de medicina intensiva.

La investigación básica es aquella dirigida a dilucidar aspectos de la fisiología, fisiopatología, etc. en sí mismos, y cuando le añadimos la palabra aplicada, nos referimos a la investigación de problemas ligados al contexto asistencial, con la finalidad de mejorar los conocimientos de cualquier índole relacionada con ellos, buscando su aprovechamiento directo. Entre ambos tipos de investigación, con indudables conexiones directas, la infraestructura sería el principal medio diferenciador. La armonización entre los medios disponibles y los objetivos a alcanzar hacen que la mayor parte de los servicios asistenciales sólo puedan afrontar la investigación básica aplicada, siendo este campo en el que nosotros estamos trabajando.

La investigación básica aplicada tiene tres etapas: la primera es la detección de los problemas, la segunda el diseño del trabajo de investigación, y la tercera se corresponde con la aplicación de los resultados. Lógicamente la metodología desarrollada en cada etapa es distinta, y podría denominarse programa de investigación, que en el caso de los servicios de medicina intensiva se aplica en pacientes caracterizados por la presencia de alteraciones multiorgánicas, y sometidos a múltiples medidas terapéuticas simultáneas. A lo largo de la

exposición vamos a utilizar un ejemplo relacionado con la neumología, que nos lleve de la mano para describir las diversas etapas en que debe desarrollarse un programa de investigación básica aplicada.

Proceso de selección de objetivos y toma de decisiones

La investigación básica aplicada requiere en su primer eslabón la detección de los problemas asistenciales y su cuantificación. En nuestro caso, y acorde con nuestra especialidad, hemos recurrido al seguimiento epidemiológico diseñado para 5 años de duración con el objetivo de estudiar las curvas de mortalidad y morbilidad de 1.230 pacientes ingresados en nuestro servicio. La finalidad de este seguimiento epidemiológico es detectar aquellas poblaciones de enfermos en las que se pueda diseñar programas de asistencia o investigación intra/extra hospitalarios. Para el ejemplo concreto que queremos desarrollar en este trabajo hemos seleccionado el síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA), cuya mortalidad es predominantemente hospitalaria, y oscila alrededor del 60 %, siendo la causa más importante de mortalidad intra-UCI, por lo cual puede considerarse un campo prioritario de investigación.

El SDRA es multietiológico, y está caracterizado por una afectación pulmonar difusa y bilateral, que cursa con un perfil agudo de presentación, una hipoxemia grave cuyo límite se ha fijado con carácter arbitrario en una PaO_2 inferior a 60 mmHg respirando una fracción de oxígeno superior a 0,5, siendo además imprescindible que la función ventricular izquierda sea normal, fenómeno objetivado con una presión pulmonar de enclavamiento inferior a 18 mmHg.

La patogenia de este síndrome está ligada a la ley de Starling, reguladora de flujos de líquidos a través de las membranas. Dicha ley se

TABLA I
MORTALIDAD GLOBAL DEL SÍNDROME DE DISTRÉS RESPIRATORIO DEL ADULTO

Mortalidad	Década 70*	Década 80**
Global	50/70 %	55/72 %
FMO	No descrito	Causa principal
CIR > 70 años	Excepcional	Rutinaria
Inmunodeprimidos	Excepcional	En aumento
Hipoxemia refractaria	Causa principal	Excepcional

*Corresponde a 1974-1977. **Corresponde a 1983-1986. FMO: fracaso multiorgánico.

aplica en la estructura alveolar en dos niveles distintos: el primero lo constituye el espacio delimitado entre la luz capilar y el intersticio alveolar, existiendo en condiciones de normalidad un trasvase de líquido que se reabsorbe, ya sea por la propia ley de Starling, ya sea por el sistema linfático, que constituye una verdadera bomba de seguridad para el alveolo; el segundo nivel esta constituido por el intersticio y la luz alveolar propiamente dicha; sin embargo, esta estructura sólo mantiene un equilibrio de presiones, pues por definición la luz alveolar debe permanecer seca.

Cuando el intersticio acumula líquido, o bien éste en una segunda etapa inunda el alveolo, hablamos de edema agudo de pulmón; si éste se ha producido por una alteración de los vectores hemodinámicos, hablamos de edema de pulmón propiamente dicho, y cuando el equilibrio de la ley de Starling se ha roto por una alteración directa de la permeabilidad, hablamos de SDRA. El proceso de resolución del líquido alveolar no puede verse como un simple mecanismo a la inversa del proceso de formación, sino que existen suficientes datos experimentales acumulados para aceptar la hipótesis de una reabsorción en parte activa, fenómeno por otro lado fisiológico, que existe en el pulmón fetal.

La mortalidad global del SDRA queda objetivada en la tabla I, en la que se comparan los porcentajes pertenecientes a dos períodos distintos, y que abarcan una década, resaltando la estabilidad de dichos porcentajes a lo largo de la década. Estas cifras, que coinciden con las de otros autores, pueden aportar más datos si se examina el motivo del fallecimiento; así se observa que en la década pasada las hipoxemias refractarias, es decir, aquellas hipoxemias que no podían corregirse con los métodos y técnicas disponibles, constituían la causa más importante de mortalidad, y sin embargo en los últimos años constituyen un problema marginal. Esto se debe a que la investigación básica en la década pasada se concentró en resolver

este problema, creando un conjunto de conocimientos en bioingeniería, que unidos a un espectacular desarrollo del conocimiento de la fisiopatología del enfermo crítico, permitió su corrección, o al menos su control. Sin embargo, la corrección de la hipoxemia no ha rebajado la mortalidad global del SDRA, habiendo exclusivamente permitido emerger otras causas de muerte, lideradas por un nuevo síndrome conocido como fracaso multiorgánico (FMO). Este nuevo síndrome se caracteriza por la instauración de manera progresiva del fallo de función de diversos órganos o sistemas. Estaría relacionado en parte con el mayor período de tiempo transcurrido desde la instauración del SDRA hasta el fallecimiento, en algunos casos superior a los 60 días. Ante esta nueva situación es evidente que debe abrirse una nueva investigación, centrada en un enfoque biológico, en contraposición al enfoque mecanicista que predominó en la década pasada. La selección de una población, con SDRA, basada en su alta mortalidad no modificada por la anterior etapa de investigación, y por tanto la necesidad objetiva de recambiar la vía de trabajo, constituyen la etapa previa obligatoria al diseño de la investigación, quedando también en evidencia que la metodología sobre la que se ha basado ésta, es decir, la epidemiología, constituye otra característica diferenciadora de la etapa que pasamos a describir.

Diseño de la investigación

Justificación e hipótesis de trabajo

La alteración de la permeabilidad del endotelio vascular se produciría por la activación o acción directa de diversas sustancias, entre las que destacan la fracción C5a del complemento, y los radicales libres de oxígeno liberados por los neutrófilos activados. Estos fenómenos bioquímicos han abierto nuevas perspectivas terapéuticas, pues ciertos fármacos presentan una

TABLA II
CRITERIOS PARA SELECCIONAR UNA TÉCNICA*

1. *Sensibilidad*, o capacidad para detectar las mínimas variaciones posibles en el volumen total del agua pulmonar
2. *Especificidad*, o capacidad de no ser influenciada por otros compartimientos con agua extrapulmonar, como pudiera ser un derrame pleural
3. *Reproducibilidad*, o capacidad de reproducir los mismos valores, siempre que las condiciones de trabajo no hayan variado
4. *Mínimo nivel de invasividad*
5. *Manejo fácil*
6. *Bajo coste*

*En nuestro caso para la determinación del agua pulmonar.

TABLA III
ETAPAS PARA LA INTRODUCCIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS EN LA ASISTENCIA

- I Desarrollo en bioingeniería
- II Comprobación experimental
- III Estandarización experimental
- IV Introducción clínica experimental
- V Introducción clínica rutinaria

actividad selectiva o antagonista de dichas sustancias (p. ej., anticuerpos monoclonales anti-fracción C5a, modernos antiinflamatorios no esteroides). La demostración de la eficacia terapéutica de estos fármacos requiere el diseño de un modelo experimental, destacando entre los diversos modelos propuestos la cuantificación directa de las variaciones inducidas en el propio edema pulmonar. Entre las ventajas de este modelo figuraría el poder trabajar con series pequeñas de pacientes, en contraposición a otros diseños tales como los basados directamente en la mortalidad, que requieren series muy amplias sólo susceptibles de reunirse en estudios multicéntricos.

En una primera aproximación a este tema decidimos como objetivos prioritarios la selección de una técnica de cuantificación del agua pulmonar y verificar su sensibilidad en el contexto clínico, mediante dos pruebas sencillas, la primera consistente en el empleo de medición de la presión positiva espiratoria final, y comprobando si ésta induce cambios en la cuantificación del agua pulmonar, o bien ventilando a los pacientes con fracciones inspiradas de oxígeno superiores al 0,8, y comprobando si los fenómenos de atelectasias por reabsorción que se producen, con los consiguientes trastornos locales de perfusión que conllevan, varían la cuantificación del agua pulmonar. Ambos mecanismos propuestos modifican profundamente los

parámetros de función respiratoria, hemodinámicos y gasométricos, por lo que cabe suponer que exista algún tipo de correlación entre dichos parámetros y el agua pulmonar.

Selección de la técnica de cuantificación del agua pulmonar y bases fisiopatológicas para su empleo

Atendiendo a los criterios expuestos en la tabla II y teniendo en cuenta que el trabajo se iba a desarrollar en pacientes en situación crítica, se seleccionó el método de doble marcador intravascular. A su vez esta técnica debe englobarse entre las etapas III y IV de la tabla III, que detalla las etapas que cualquier técnica debe seguir para su introducción en la clínica.

La cuantificación del agua pulmonar se basa en una proporción clásica, $C1.V1 = C2.V2$, donde C y V representan concentraciones y volúmenes. Un marcador fácilmente detectable, que en nuestro caso es el suero glucosado a temperaturas entre 0 y 5 °C, actuando la propia temperatura como marcador, junto con el colorante verde de indocianina, que actúa a su vez también como marcador. C1 y V1 se controlan al prepararse para su inyección en el territorio vascular de arteria pulmonar, mientras que C2 se conoce por la lectura de un dispositivo termo o fotosensible en territorio aórtico, por lo que V2 puede derivarse fácilmente. V2 se correspon-

de con el territorio pulmonar, donde el agua pulmonar se distribuye en dos compartimientos distintos, uno extravascular y otro intravascular; éste es el motivo de que para objetivar el agua pulmonar propiamente dicha sea necesario sustraer del volumen total detectado de agua, el agua del compartimiento vascular. Este objetivo se consigue utilizando dos marcadores, uno de libre difusión y otro puramente intravascular, o bien el mismo marcador analizado en distintos momentos de su tránsito por el territorio vascular. En este último caso es el propio suero glucosado frío el marcador que se utiliza. Nosotros hemos optado inicialmente por esta técnica, no sólo por ajustarse bien a los requisitos de la tabla II, sino también por haberse demostrado experimentalmente una superponibilidad entre la masa térmica detectada por el marcador y el volumen de agua real extravascular, determinado por gravimetría, superior al 80 %. El agua pulmonar extravascular puede, a su vez, dividirse en varios subcompartimientos, que serían intersticial, peribronquiolar e intraalveolar, cada uno a distintas distancias al capilar alveolar, lo que introduce a su vez variaciones en los tiempos de equilibrio entre los subcompartimientos citados y el marcador. Finalmente en el caso de estar excluida la perfusión de una zona del pulmón, pueden quedar excluidas amplias zonas de edema, que no entran en contacto con el marcador, falseando los resultados cuantitativos del agua pulmonar. Finalmente, y teniendo también en cuenta la tabla II, la reproducibilidad del método sólo permite tomar en cuenta variaciones superiores al 8 % en relación con el valor basal, para atribuir dicha variación a factores biológicos ajenos a dicho fenómeno de reproducibilidad.

Material y método

El estudio del agua pulmonar requiere el manejo de las siguientes técnicas complementarias:

1. Asistencia ventilatoria mecánica con respirador volumétrico, que pueda manejarse como mínimo en modalidad controlada o modalidad asistida intermitente. Entre sus prestaciones debe poseer la presión positiva espiratoria final (PEEP), y que permite mantener una presión residual supraatmosférica, con lo que se consigue estabilizar las pequeñas vías aéreas e incrementar la capacidad residual funcional.

2. Cateterización de aorta y arteria pulmonar, con posibilidad simultánea de medición de presiones, temperatura del torrente circulatorio y

gasto cardíaco. La monitorización debe permitir el registro de los valores obtenidos, para descartar artefactos.

3. Microprocesador para derivar el agua pulmonar mediante los gastos cardíacos obtenidos por los catéteres arterial pulmonar y aórtico y sus tiempos medios de declive. En caso de no disponer del microprocesador, todo el proceso puede hacerse manualmente, mediante planimetría de los gastos cardíacos.

4. Registro de dos canales y alta sensibilidad para visualizar las curvas de temperatura obtenidas por los dos termosensores, pulmonar y aórtico.

5. Gasómetro calibrado para altas concentraciones de oxígeno.

Población a estudiar

1. Normalización de la muestra para que los resultados sean comparables. En medicina intensiva esto se consigue mediante tres sistemas de valoración: a) *simplified acute physiologic score* (SAPS), en el que mediante 14 parámetros de recogida normal en una UCI se deriva una puntuación proporcional a la gravedad del paciente, permitiendo agrupar a los enfermos por probabilidades de supervivencia; b) *therapeutic intervention score system*, que cuantifica niveles de actuación terapéutica a la cabecera del paciente (los mayores niveles de actuación se corresponden con mayor mortalidad), y c) cuantificación de la función de los diversos órganos y sistemas del organismo, cuando éstos fracasan. Merced a estos tres sistemas de normalización, se puede trabajar con poblaciones homogéneas.

2. Criterios de inclusión, que en nuestro estudio inicial han quedado reducidos a presentar un SDRA, superior a 48 h de evolución para que el sustrato anatómico fuese un edema lo más puro posible, y que no existieran variaciones hemodinámicas superiores al 20 % de los valores basales a lo largo del tiempo del estudio.

3. Criterios de exclusión: inestabilidad hemodinámica o lesiones a distancia que contraindicasen el empleo de PEEP.

4. En esta misma subetapa debe introducirse, como primer paso, la información al paciente o a sus familiares, y la autorización, a ser posible escrita, para la realización de la prueba. Es obligado recordar siempre que bajo ninguna circunstancia puede someterse al paciente a ningún riesgo adicional por realizar una prueba.

TABLA IV
COMPARACIÓN Δ PEV-PEEP ($FIO_2 < 1$)

	Basal	PEEP	p
Total (nl)	1.004 \pm 511	1.044 \pm 442	NS
Peso (ml/kg)	14 \pm 6	13 \pm 5	NS
Porcentaje	100	97 \pm 15	NS

TABLA V
COMPARACIÓN Δ PEV- FIO_2
INCREMENTO FIO_2 BASAL- $FIO_2=1$

	FIO_2 basal	$FIO_2=1$	p
Total (nl)	975 \pm 461	953 \pm 417	NS
Peso (ml/kg)	12 \pm 5	12 \pm 4	NS
Porcentaje	100	99 \pm 18	NS

Protocolo

Engloba los subapartados que presentamos a continuación:

1. Definición del grupo control. En nuestro caso se utiliza un control interno, pues son los propios pacientes quienes sirven para definir las condiciones basales.

2. Registro de los parámetros elementales, constituidos por los valores hemodinámicos, gaseométricos, de función respiratoria, y de agua pulmonar.

3. Cálculo de los parámetros derivados de los elementales y normalización de los mismos.

4. Cálculo de los valores de las presiones mediastínicas para derivar las presiones transmuralas.

5. Introducción de las modificaciones en cuanto a ZEEP/PEEP de +10 cmH₂O, y $FIO_2 < 0,8 / FIO_2 > 0,8$ con intervalos de 20 entre las diversas lecturas de los valores elementales.

6. Realización de la prueba por personal entrenado y cualificado para el mismo.

Apoyo estadístico e informático

Debe realizarse inicialmente para definir la amplitud de la muestra a estudiar y su técnica de agrupación. En nuestro caso el muestreo se ha realizado sobre 21 pacientes, con un máximo de tres estudios por paciente, separados por un intervalo mínimo de 12 h. En cuanto a las pruebas estadísticas utilizadas para el análisis final, han sido la prueba de t, el ANOVA y la regresión lineal múltiple.

Resultados

Quedan reflejados en las tablas IV, V y VI. El incremento de la PEEP no ha producido ninguna variación estadísticamente significativa en relación con el agua pulmonar.

El incremento de la fracción inspirada de oxígeno tampoco ha producido ninguna variación estadísticamente significativa en relación con el agua pulmonar.

La evolución de los valores hemodinámicos y de oxigenación ha presentado variaciones estadísticamente significativas y superponibles a los valores característicos definidos en otros trabajos. Sólo existe una correlación positiva entre los parámetros de agua pulmonar y gradiente alveoloarterial de oxígeno, junto con el índice de oxigenación.

Análisis de los resultados

Pone de manifiesto que la técnica de cuantificación del agua pulmonar mediante un solo marcador no ha demostrado ninguna variación estadísticamente significativa en el agua pulmonar.

Análisis de los resultados, conclusiones y fijación de objetivos

Tal como señalábamos, el método de cuantificación del agua pulmonar por un solo marcador no ha detectado variaciones estadísticamente significativas al analizar los cambios inducidos al modificar la PEEP o la FIO_2 . El análisis de estos resultados puede evidenciar determinadas

TABLA VI
COMPARACIÓN PEEP-HEMODINÁMICA, INCREMENTO ZEEP-PEEP

Parámetro	Basal	PEEP	p
IC (l/min/m ²)	4,5 ± 1,6	3,9 ± 1,4	<0,05
TA (mmHg)	74 ± 15	73 ± 1,4	NS
PAP (mmHg)	24 ± 5	26 ± 5	<0,05
PCP (mmHg)	12 ± 3	14 ± 3	<0,05
PVC (mmHg)	10 ± 3	11 ± 4	NS
RPT (din.seg.cm ⁵)	497 ± 250	647 ± 339	<0,05

conclusiones de las que se deriven objetivos operativos. Un paso previo es revisar todos los eslabones del trabajo que hayan podido influir en ellos:

1. Error técnico: en la lectura de los resultados, producido por fenómenos de recirculación del marcador. Su comprobación requiere el estudio comparativo con un nuevo marcador para que dicho fenómeno de recirculación pueda objetivarse. Incremento en los tiempos de tránsito del marcador producido por una mayor anomalía de la relación ventilación/perfusión, que debe ser comprobado mediante curvas de aclaramiento isotópico pulmonar. Finalmente, en caso de no detectarse ningún error, deberá volverse a comprobar la relación entre la masa térmica detectada y el volumen real de agua pulmonar extravascular, objetivado mediante gravimetría en animales de experimentación.

2. Error en el diseño estadístico, ya sea en la fase inicial de definición de la muestra, ya sea en la fase de análisis estadístico de los resultados. Requieren un replanteamiento del mismo.

3. Finalmente, el análisis de los resultados no necesariamente indica falta de sensibilidad de la técnica, sino que pudiera tener otras explicaciones, como la redistribución del edema hacia los manguitos peribronquiales, que por estar a mayor distancia de los capilares no se equilibrarían o incluso quedarían excluidos del cómputo de agua total, lo cual compensará otras zonas adyacentes al marcador tanto con el empleo de PEEP como con el empleo de $FI_{O_2} > 0,8$. En cualquier caso la comprobación de este extremo requiere la repetición del diseño global del trabajo variando los niveles de

PEEP utilizados y los tiempos de muestreo. Así mismo, el estudio anatomopatológico del pulmón en animales de experimentación constituiría el completo ideal de este aspecto del trabajo.

4. En cuanto a la técnica en sí misma debe considerarse en fase experimental todavía, o lo que es lo mismo, rechazar su empleo en la clínica humana como prueba asistencial, pues no es útil para decisiones en este contexto.

Recomendaciones finales

A lo largo de este trabajo hemos intentado combinar la exposición de unos de los campos de investigación básicos en el paciente neumológico, a la vez que se han recalcado las etapas de un programa de investigación básica aplicada.

BIBLIOGRAFÍA

1. VÁZQUEZ G. Síndrome de distrés respiratorio del adulto. *Medicina Interna* 1986; 4:121-155.
2. ELSTON R. *Essentials of biostatistics*, Filadelfia, Ed. Davis Co., 1987.
3. BAILAR G, LOUIS T, LAVARI P, POLANSKY M. A classification for medical research reports. *N Engl J Med* 1984; 311:1.482-1.487.
4. MOSES L. Statistical concepts fundamental to investigation. *N Engl J Med* 1983; 312:890-897.
5. EMERSON J, COLDITZ G. Use of statistical analysis in the *New England Journal Medicine*. *N Engl J Med* 1983; 309:709-713.
6. CHINAR F. Estimation of extravascular lung water by indicator dilution techniques. *Cir Research* 1975; 37:137-145.

DISCUSIÓN

S. ERILL: Yo quisiera preguntar si en el curso de estos trabajos o de otros a los que no haya podido hacer referencia ha utilizado estas técnicas para evaluar el efecto de algún fármaco.

G. VÁZQUEZ: No. El problema radica en que en la última década el distrés respiratorio del adulto se orientó con una concepción puramente mecanicista, enfocando el tratamiento a la sim-

ple corrección de la hipoxemia con ventilación asistida y otras técnicas de apoyo cardiorrespiratorio. Sin embargo, se ha demostrado que esto no es real. La hipoxemia se controla pero la mortalidad persiste. A partir de ahí es imperativa la evaluación de nuevas terapéuticas que necesariamente incluirán medidas farmacológicas, lo cual requiere un modelo experimental en clínica muy bien validado. Lo que aquí se ha presentado corresponde a la comprobación de un modelo experimental.

S. ERILL: Desde hace mucho tiempo me ha interesado un aspecto del edema agudo de pulmón que se desarrolla en los heroínómanos y en el cual cabe especular que pueda haber una participación de histamina liberada por la heroína, puesto que como es sabido los narcóticos son potentes liberadores de histamina. Se han ensayado en esta situación anti-histamínicos de tipo H₁, pero no se han ensayado, que yo sepa, antagonistas de tipo H₂, y me gustaría especular sobre la posibilidad de que técnicas de este tipo pudieran, por lo menos en un modelo animal, permitir observar un cierto efecto de unos y otros, y eventualmente la sumación de efectos si se emplearan ambos.

G. VÁZQUEZ: Es un enfoque interesante pero creo que el edema agudo de pulmón de los heroínómanos es un mal ejemplo del distrés respiratorio del adulto, porque no se asocia a mortalidad, es decir, tiene un perfil de evolución muy rápido, es reversible, en 24 o 48 horas se ha recuperado el paciente y basta mantenerlo ventilado o despierto con antagonistas. Ello implica que cualquier ensayo terapéutico basado en la evaluación de la mortalidad o morbilidad sería prácticamente inviable, aunque lógicamente sí podrían estudiarse los efectos del fenómeno sobre aspectos hemodinámicos o de funcionalismo respiratorio.

J. COSÍN: Una pregunta muy concreta ¿inyectan uno de los marcadores por vía venosa?

G. VÁZQUEZ: En arteria pulmonar.

J. COSÍN: ¿Y el otro marcador?

G. VÁZQUEZ: Simultáneamente en la misma jeringuilla.

J. COSÍN: ¿Han utilizado algún marcador por vía inhalatoria?

G. VÁZQUEZ: Hay técnicas descritas con marcadores administrados por esta vía. Aunque pueden en algunas ocasiones tener mayor sensibilidad, no son reproducibles en el enfermo crítico ni se pueden repetir seriadamente a la cabecera del paciente. Nuestra técnica es re-

producible y sólo requiere la inyección como máximo de 20 ml de dextrosa por estudio.

J. COSÍN: De todas formas, el verde de indocianina es de manejo bastante difícil porque difunde muchísimo, y a veces al repetir la medición del gasto en dos momentos distintos se obtienen valores completamente diferentes. Hace algunos años lo utilizamos y siempre teníamos problemas.

G. VÁZQUEZ: Lógicamente, un aspecto a tener en cuenta es la variabilidad interindividual entre distintos observadores al utilizar esta técnica. Conviene controlar este factor para optimizar en lo posible la reproducibilidad del método.

A. ORDINAS: Quisiera hacer un comentario ajeno a esta ponencia, dirigido a los jóvenes MIR presentes en esta reunión. Quizá pueda dar la impresión de que los médicos investigadores que hemos presentado nuestras comunicaciones a lo largo del día hemos dispuesto de grandes medios o grandes facilidades para llevar a cabo nuestros proyectos. Al menos por lo que a mí respecta, aunque creo que será un sentimiento compartido por la mayoría de ponentes, ha supuesto un extraordinario esfuerzo personal llevar a cabo proyectos de investigación dentro de las instituciones sanitarias, porque el concepto del médico investigador no está muy extendido, es decir, la carga asistencial es tan enorme que es casi imposible intentar llevar a cabo alguna investigación durante la jornada de trabajo, por lo que es obligado utilizar por ejemplo los fines de semana. Sin embargo, comentábamos con el Dr. Cosín que probablemente en un futuro próximo el número de médicos dedicados exclusivamente a la asistencia de alguna manera se irá saturando y tendrá que surgir la figura del médico que casi por obligación deba dedicar al menos parte de su tiempo a la investigación. Además, ha de llegar el momento en que un gran número de médicos de las instituciones sanitarias hagan investigación porque ésta es la única manera de que vaya progresando la sanidad en nuestro país, como se ha demostrado en los países donde ya se aplica. Es recomendable que en los cuatro años que ustedes van a estar en instituciones sanitarias y a pesar de la enorme carga asistencial, procuren dedicar parte de su tiempo a la investigación, ya que en un futuro no muy a largo plazo les va a ser de gran utilidad. Y pienso que los jefes de servicio que reciban a estos nuevos MIR tendrían que insistir en esto, porque la formación de un médico residente no

es sólo asistencial sino que tiene que ser también investigadora.

J. COSIN: Probablemente en un futuro, si este país sigue una evolución occidental normal, los puestos de trabajo de la medicina asistencial van a decrecer en favor de los de la medicina investigadora. Y no sólo eso, sino que los puestos de trabajo en instituciones de la red hospitalaria de este país contemplarán probablemente la dedicación parcial a la investigación. A título de primicia quisiera anunciar que en nuestra especialidad de cardiología, la Comisión de la Especialidad ha aprobado formalmente la posibilidad de dedicar un año de la residencia en Cardiología a la investigación.

Es de esperar que a esta iniciativa sigan otras parecidas.

S. ERILL: Me parece que ha llegado el momento de dar las gracias a todos los participantes. Es evidente que la investigación es siempre una aventura intelectual y que a todos aquellos que de una u otra manera tenemos una relación con esta aventura nos ha de satisfacer ver que se puede compaginar el trabajo clínico con la investigación. Debo decir que, por lo menos para mí, la asistencia a esta mesa redonda ha sido enormemente enriquecedora. Y quizá pueda hablar en nombre de todos. Muchas gracias.

