

Vol 19 no 3 Julio/Septiembre 2008

*T*rauma

ISSN: 1888-6116

FUNDACIÓN MAPFRE

**ORIGINAL**

La ética en la práctica. Cuando algo se hace mal: del error médico a la mala praxis

Ethics in Practice. When something is done wrong: from the medical error to the malpractice

León Sanz P

Departamento de Humanidades Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra

Resumen

Objetivo: Analizar dos de los aspectos éticos más importantes relacionados con el error médico: la comunicación a los pacientes y sus familias; y la obligación moral de prevenir e intentar disminuir esta realidad.

Diseño: Los principios ético-médicos recomendados coinciden con los propios de la medicina en general, y son subrayados por las directrices específicas que han publicado las organizaciones profesionales, como la Academia Americana de Cirujanos Ortopédicos (AAOS). Se analizan las consecuencias que tiene para el profesional y para el paciente no distinguir entre error médico y mala praxis. Se estudia la repercusión emocional en el profesional y en los pacientes. Así como los aspectos institucionales y la implantación de programas de prevención de errores médicos en los Centros asistenciales, que han de incluir el análisis del error técnico con la cooperación de todos los profesionales y la determinación sobre qué se dice a la familia, quién ha de hacerlo y cómo.

Conclusiones: Admitir los errores, pedir disculpas por lo que ha salido mal, mejora la relación médico-paciente, mejora la confianza en el profesional y ayuda a prevenir errores.

Palabras clave:

Error médico, mala praxis médica, ética médica, derechos de los pacientes.

Abstract

Objective: To analyse two of the most significant ethical issues related to medical errors: informing patients and relatives; and the moral duty to prevent and try to minimise this situation.

Design: The recommended ethical and medical principles are consistent with those of medicine in general and are underpinned by the specific guidelines published by professional organisations, such as the American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). The consequences for the professional and the patient of not distinguishing between medical error and malpractice are analysed. The emotional impact on professionals and patients is studied as are the institutional issues and implementation of programmes for the prevention of medical errors at healthcare centres, that must include the analysis of the technical error with the collaboration of all professionals and determination about what the family should be told, by whom, and how.

Conclusions: Admitting errors, apologising for wrongful actions, improving the physician-patient relationship, improving trust in the professionals and help prevent errors.

Key words: medical error, medical malpractice, medical ethics, patient rights.

Introducción

Desde los años 80 del siglo XX se ha incrementado el número de demandas por mala praxis médica en los tribunales de justicia. La mayoría proceden de pacientes atendidos

por especialistas de áreas quirúrgicas, lo cual, en parte es debido al carácter invasivo de sus prácticas y a que éstas se relacionan con cierta exigencia de resultados. En el caso de la cirugía ortopédica, se dice que es un ámbito inmejorable para revisar el error médico, por dos razones: las complicaciones derivadas de la práctica médica en el sistema músculo-esquelético raramente matan, pero dejan secuelas y discapacidades; en segundo lugar porque a través de las radiografías y de las técnicas de imagen, se puede documen-

Correspondencia

P. León. Departamento de Humanidades Biomédicas
Facultad de Medicina. Universidad de Navarra
Irunlarrea 2. Pamplona, 31001
mpleon@unav.es



tar lo sucedido, incluso pasado bastante tiempo después de la intervención.

En este artículo nos proponemos subrayar algunos aspectos ético-deontológicos que conlleva el error médico, cuestión necesaria dado el elevado número de errores médicos y de complicaciones en las intervenciones que se siguen contabilizando, a pesar de los avances del conocimiento y de la técnica. El tratamiento de los errores médicos es un asunto de mucha densidad ética, no sólo judicial. Concretamente nos referiremos a la comunicación a los pacientes y sus familias; y a la seria obligación moral de prevenir e intentar disminuir el número de errores.

Comenzaremos por analizar las consecuencias que tiene para el profesional y para el paciente no distinguir entre error médico y mala praxis. Como veremos, en estos casos los principios ético-médicos recomendados coinciden con los propios de la medicina en general, y son subrayados por las directrices específicas que han publicado las organizaciones profesionales, como la Academia Americana de Cirujanos Ortopédicos (AAOS) [1,2].

1. Mala praxis o error médico

Lo que caracteriza la mala praxis es que haya habido un daño causado por la intervención del médico, que se añade al propio de la enfermedad o del tratamiento aplicado. Este perjuicio, en el caso de una demanda, se ha de poder probar y se ha de establecer una relación causal entre la prestación profesional y el daño ocasionado.

Sin embargo, no se puede equiparar el error médico con la mala praxis porque la realidad muestra que la mayoría de los errores no se han de atribuir a mala praxis o a negligencias individuales. En el caso de la cirugía ortopédica, Bhattacharyya y Yeon [3] consideran que sólo alrededor del 28% de los errores y complicaciones serían debidos a negligencias.

Se ha de tener en cuenta que el número de errores es demasiado alto. El conocido informe, *To Err is Human: Building a Safer Health System*, publicado por el Institute of Medicine de EEUU, en 1999, atribuía 98.000 muertes/año a errores médicos, definidos en un sentido amplio, es decir, no sólo los ocasionados por los médicos [4].

Para el profesional, la identificación del error médico con la mala praxis o negligencia además de dificultar su reconocimiento, tiene un coste que puede ser muy grande: ser demandado por el paciente o por su familia para obtener una compensación económica o bien para dejar constancia pública de los malos resultados obtenidos por un profesional.

Al desgaste moral que supone la experiencia de un proceso judicial, se suman el tiempo y dinero empleados en la

preparación de la defensa y en la satisfacción del fallo. A lo que se añade la necesidad de suscribir pólizas de seguros de responsabilidad civil, que para los cirujanos son siempre elevadas.

Para el paciente equiparar error médico con mala praxis o negligencia también tiene efectos perniciosos, ya que la precaución excesiva por evitar la reclamación puede llevar a la práctica de una medicina defensiva, más cara y contraria a la ética médica [5,6].

Las investigaciones llevadas a cabo con pacientes y familias afectados por los fallos médicos han mostrado que resultan doblemente afligidos. Pues, además de padecer los efectos del error médico, un alto porcentaje de enfermos y sus familias tienen miedo de aumentar el daño si manifiestan sus sentimientos o revelan los errores del profesional. Es frecuente que el paciente sufra el abandono del profesional, justamente, cuando más atención necesita [7-9]. Por lo que no sólo los médicos se sienten reprobados por una actuación que ha sido errónea, también el paciente y su familia experimentan la sensación de culpabilidad.

2. El profesional ante la comunicación de los hechos adversos

A pesar de la preocupación por una posible demanda, la doctrina ético-deontológica es clara: cuando las complicaciones que sufre un paciente son debidas a errores del médico se ha de informar al paciente de lo sucedido.

Informar no es sólo un deber para el profesional

Conocer el error interesa al paciente. Un paciente tiene derecho a recibir la información médica que le afecta puesto que es el primer responsable de su propia salud y a él le corresponde la toma de decisiones. Y saber que ha habido un error afecta a las disposiciones que vaya a tomar respecto a sus tratamientos y a las compensaciones derivadas del error. El profesional habrá de ponderar el modo de decirlo para evitar el posible daño que la comunicación pueda ocasionar al enfermo.

Sin embargo, la realidad muestra que las presiones sociales y profesionales hacen difícil que los médicos u otros profesionales implicados revelen sus errores. Al parecer, sólo en un tercio de los casos, los pacientes habían sido informados y habían recibido información por parte de los profesionales causantes de los daños [10].

Los mismos estudios señalan que la mayoría de los pacientes querrían que sus médicos les comunicaran la verdad. Y hasta el 98% de los pacientes desearían que el médico les comunicara hasta el mínimo error [11].



La confianza del paciente

La AAOS reconoce que el error médico es algo inevitable en la práctica médica y que comunicar los errores con rapidez y honestidad ayuda a mantener una relación de confianza con los pacientes y sus familias. Y es evidente que la pérdida de confianza en el médico y en el hospital es mucho mayor en el caso contrario [1].

En contra de la revelación del error

Las encuestas señalan que tanto para los profesionales como para las instituciones, la primera razón que se interpone en la revelación de un error es el miedo a una demanda. Con frecuencia el hospital y la compañía aseguradora aconsejan que no se admita la posibilidad de que haya habido un error y es frecuente que los expertos legales recomienden evitar el uso de palabras como «error», «falta», «negligencia» o «equivocación» [12,13]. Por lo que el profesional, al revelar lo ocurrido, añade a una posible demanda el miedo a que el seguro no cubra la reclamación.

Sin embargo, no hay evidencia empírica que indique que decir la verdad perjudique al médico, ya que obrar así previene la posibilidad de un proceso por mala praxis [14]. Por el contrario, los estudios de campo indican que hay más pacientes que reclaman si no se reconoce el error que si se admite, porque el resentimiento aumenta el riesgo de promover una acción legal agresiva.

La carga emocional

Estar relacionado con un error médico supone un desgaste emocional. Tras un error se experimenta la sensación de culpabilidad, una experiencia de vergüenza, una falta de seguridad. También está descrita la sensación de pérdida de prestigio. Equivocarse o cometer un error supone una humillación que es mayor si el descubrimiento ha sido hecho por un colega. Los estudios indican que cuando el profesional ignora esta reacción de desaliento tiene más problemas y puede incurrir en más errores [15].

Sin embargo, hasta ahora, en las Facultades de Medicina o en los Programas de la especialidad, como el de Cirugía Ortopédica y Traumatología, no se enseña la necesidad de admitir y discutir los errores [16]. Además, existen circunstancias o factores que llevan a auto-disculparse o a justificar el error: puede ser achacado a las malas condiciones de trabajo, a la sobrecarga de tareas, a una supervisión inadecuada, a la falta de comunicación entre colegas e incluso a las peculiares condiciones o modos de ser del paciente.

De ahí que la Declaración de la AAOS titulada *La comunicación de los resultados adversos* insista en que el cirujano ortopédico ha de anteponer el interés del paciente y

«comunicarle directamente, con honestidad y de forma compasiva, tan pronto como sea posible, lo ocurrido» [1,14]. También este es el mandato explícito del Código ético de la especialidad Cirugía Ortopédica [1]: la responsabilidad ética de ser veraz se antepone a la preocupación por la acción legal.

Pero corresponde a la prudencia de cada profesional la aplicación de las normas de la ética médica teniendo en cuenta las circunstancias (del profesional, del equipo, de la institución o del paciente) que concurren en cada momento. No parece necesario revelar los errores triviales, no comunicar un error sustantivo exigiría tener razones y pruebas que justifiquen esa actitud.

Cuando el paciente plantea en la consulta un error de un colega

Situación especialmente delicada es la consulta de un paciente acerca de la actuación profesional de otro colega. En estos casos se ha de ser especialmente prudente en la evaluación del caso y cuestionarse si se conocen todos los hechos relevantes. Puede haber datos o circunstancias acedidas durante una intervención quirúrgica que los pacientes desconozcan y que puede justificar las decisiones tomadas por el cirujano. Además, es habitual y lógico que los médicos disientan sobre la conducta a seguir ante determinadas situaciones clínicas. Son situaciones en que hay que mantener la lealtad con el paciente y con el colega porque no se puede dañar la reputación de un colega injustificadamente. Esa conducta sería aún más grave si las críticas o descalificaciones se hicieran ante otros pacientes o ante personas ajenas a la profesión y si conllevaran repercusiones profesionales o económicas (CEDM, Art. 31).

3. La prevención de los errores

Evitar los errores es una cuestión de justicia. Sería injusto tolerar que pueda repetirse un incidente que perjudique al paciente, al profesional o al hospital. La ética médica demanda la disminución y la prevención del error para lo cual apuesta por una gestión transparente de estos sucesos que permita mejorar la calidad asistencial. Ningún error debería ser archivado sin más: necesita un protocolo específico sobre cómo se ha producido y cómo se puede evitar en el futuro.

Desde hace años, la Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations insiste en que promover la cultura del reconocimiento de los errores es la manera más segura de disminuirlos. Y ha advertido sobre el carácter institucional de muchos errores. Este cambio afecta a los profesionales: los Estándares de la AAOS para las relacio-



nes interprofesionales (2005) recomiendan que los especialistas en COT trabajen junto a otros profesionales con el fin de reducir los errores médicos, aumentar la seguridad de los pacientes y optimizar los resultados [1]. Además, tradicionalmente, han sido los especialistas de áreas quirúrgicas los que han liderado el establecimiento de medidas de seguridad en los quirófanos y otras instalaciones de los centros asistenciales.

La institución y los errores

Esta nueva actitud frente a los errores implica a las instituciones, que habrán de adoptar políticas que faciliten la comunicación (no la denuncia) de los fallos sucedidos o inminentes. La prevención de los errores facilita la buena praxis médica, cuestión que afecta al presupuesto de gestión económica y a la gestión ética.

Los centros habrán de asumir las consecuencias de los errores, sustituyendo la ética de culpabilización y castigo por una ética de análisis de error y prevención de riesgos. Se trata de la única manera de facilitar la detección y posterior análisis de estos hechos. Además, como se ha comprobado, toda persona que se ha visto envuelto en un error necesita una estructura y un soporte también afectivo. Es un caso paradigmático para expresar que el hospital es un organismo ético [7].

Se pueden observar diversos planteamientos en la implantación de un programa de prevención de errores médicos. Una postura podría ser la del centro que establece y aprueba un documento marco sobre esta cuestión. Ese texto definiría la política del hospital y haría más conscientes a quienes trabajan en esa institución de lo que implica ese punto y de cómo va a ser considerado el error médico por parte del equipo de dirección o gestión. Sería una estrategia de carácter programático.

Otro planteamiento, que supone un paso más, podría ser establecer el procedimiento de comunicar los errores, el procedimiento de estudiarlos con indicación de las instancias y personas que deberán en cada caso hacerlo, el procedimiento para acordar los remedios que hayan de aplicarse y el modo de poner esas medidas en práctica y, finalmente, el procedimiento para seguir la eficacia de las soluciones propuestas.

Es evidente que la primera postura es más fácil de llevar a cabo y de que sea aceptada, pero corre el riesgo de convertirse en un papel más que se archiva y apenas se recuerda.

Para establecer la segunda estrategia tendrían que intervenir necesariamente las diversas instancias del hospital, los encargados del manejo de riesgos, la dirección del centro, el servicio de atención a los pacientes, la comisión de mortali-

dad y morbilidad, la asesoría jurídica, la comisión de calidad y la comisión de ética asistencial.

Implantar un programa de prevención de errores médicos puede suponer largos y fructíferos debates. También reflejará las dificultades de aceptación, por parte de todos, de los medios y de la normativa a implantar.

El modo de gestionar los errores

Un programa de prevención de errores médicos que busque alcanzar cierta eficacia ha de incluir, al menos:

1. El análisis del error técnico, es decir, el estudio de las causas que lo han producido que en algunos casos implicará la reconstrucción del episodio y la adopción de medidas para evitar que se pueda repetir, como por ejemplo, la monitorización o control de los sistemas, la revisión de los sistemas de información o la relación entre los servicios clínicos y los servicios básicos, etc.
2. Las cuestiones de interrelación profesional, puesto que parece necesaria la cooperación de todos, incluidos los «protagonistas» del accidente para poder analizar y evitar nuevos errores.
3. La determinación sobre qué se dice a la familia, quién ha de hacerlo y cómo. Es necesario crear puentes que faciliten la intermediación con los pacientes y buscar soluciones para cada caso. Lo cual pasa por interesarse por los pacientes que han sido objeto de un error.

En definitiva, un programa de prevención de errores médicos supone aprender de ellos, para lo cual hay que identificarlos, admitirlos, analizarlos y corregir las situaciones o circunstancias en las que se pueden repetir.

Pedir perdón como política profesional e institucional

En cerca de 30 estados de los EEUU, en respuesta a la dificultad para el reconocimiento de los errores derivada del incremento de las demandas por mala praxis médica, se han establecido las llamadas *I'm sorry laws*. Estas leyes promueven la declaración de los errores médicos sin que esta revelación sea prueba de culpabilidad. Disminuye así el riesgo y por lo tanto el miedo a una demanda legal para las instituciones y los profesionales que se acojan a ellas [11]. Estas regulaciones, que varían de un Estado a otro, suponen la reacción de la sociedad ante situaciones que han acabado siendo perniciosas para todos: para los profesionales, para las instituciones y, por supuesto, para los pacientes. Esta reforma ha subrayado los principios que la ética ha defendido siempre respecto al error médico, ya que la honestidad y la buena comunicación son los mejores antídotos.

Todavía es pronto para conocer los resultados de la implantación de estas leyes, pero los datos recogidos en el Es-



tado de Colorado, entre enero de 2000 y octubre de 2006, son optimistas: en un total de 3.200 casos, sólo el 25% de los pacientes recibieron una compensación económica (5.400 \$ por caso). En siete de ellos, a pesar de la indemnización, los pacientes interpusieron una demanda que condenó a los profesionales en dos ocasiones. Y de los 2.400 errores que no fueron indemnizados, 16 acudieron a los tribunales y seis de ellos obtuvieron así una recompensa monetaria [14].

Conclusion: el valor de una disculpa

En resumen, todo médico es humano y comete errores. Admitir los errores, pedir disculpas por lo que ha salido mal, mejora la relación médico-paciente, mejora la confianza en el profesional y ayuda a prevenir errores. Parece que también disminuye el coste legal y las reclamaciones.

El análisis ético de los errores médicos insiste en la comunicación de los errores como algo esencial para mejorar la calidad de la atención médica. De ahí se han derivado nuevos modos de resolver los conflictos entre los pacientes y los médicos o los centros asistenciales, así como la implantación de fórmulas para compensar económicamente el daño causado, sin que sea necesaria la sentencia de la culpa legal, ya sea civil o penal [15].

Al profesional y al hospital les va mucho en ello. Es algo más que un índice de calidad. Ambos se juegan la alternativa de ser un hospital vivo o una institución «quemada» [7,16]. No en vano, el famoso cirujano parisino de la Ilustración, Jacques Tenon (1724-1816), decía que «el estado del hospital mide la naturaleza de una civilización» [17]. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Academy of Orthopaedic Surgeons. Guide to the Ethical Practice of Orthopaedic Surgery. 7 ed.; 2007.
2. León Sanz P. Cuestiones éticas en la Cirugía ortopédica y traumatología. Manual Secot de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Madrid: Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Editorial médica Panamericana (en prensa).
3. Bhattacharyya T, Yeon H. «Doctor, Was This Surgery Done Wrong?» Ethical Issues in Providing Second Opinions. *J Bone Joint Surg (Am)* 2005; 87-A:223-5.
4. To Err is Human: Building a Safer Health System. Washington DC: Institute of Medicine, National Academy Press; 1999.
5. Herranz Rodríguez G. Comentarios al código de ética y deontología médica. Pamplona, EUNSA; 1992.

6. Organización Médica Colegial (OMC). Código de ética y deontología médicas (Art. 18.2). Madrid; 1999.
7. Herranz Rodríguez G. Algunos aspectos del no dañar en el hospital de hoy. *Rev Med Univ Navarra* 2006; 50:38-40.
8. Delbanco T, Bell SK. Guilty, afraid, and alone--struggling with medical error. *N Engl J Med* 2007; 357:1682-3.
9. Betsy M, Capozzi JD, Rhodes R. The Human Form. Accepting the Prioritization of Patient Values. *J Bone Joint Surg (Am)* 2005; 87-A:1653-5.
10. Blendon R, DesRoches C, Brodie M, Benson J, Rosen A, Schneider E, et al. View of practicing physicians and the public on medical errors. *N Engl J Med* 2002; 347:1933-40.
11. Witman AB, Park DM, Hardin SB. How do patients want physicians to handle mistakes? *Arch Intern Med* 1996; 156:2565-9.
12. F Fagadau Bender. «I'm Sorry» Laws and Medical Liability. *Virtual Mentor* 2007; 9:300-4.
13. Studdert DM, Mello MM, Gawande AA, Gandhi TK, Kachalia A, Yoon C, et al. Claims, errors, and compensation payments in medical malpractice litigation. *N Engl J Med* 2006; 354:2024-33.
14. Gallagher TH, Studdert D, Levinson W. Disclosing harmful medical errors to patients. *N Engl J Med* 2007; 356:2713-9.
15. Christensen JF, Levinson W, Dunn PM. The heart of darkness: The impact of perceived mistakes on physicians. *J Gen Int Med* 1992; 7:424-31.
16. Patey R, Flin R, Cuthbertson BH, MacDonald L, Mearns K, Cleland J, et al. Patient safety: helping medical students understand error in healthcare. *Qual Saf Health Care* 2007; 16:256-9.
17. Tenon J. Mémoires sur les hôpitaux de Paris. Paris: University Microfilms International; 1979,1788.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.

ORIGINAL

Aspectos proteómicos y genéticos de la resistencia a la aspirina

Proteomics and genetics aspects of aspirin resistance

Mateos-Cáceres P J¹, Azcona L¹, Fernández-Ortiz A², Sacristán D¹, Bernardo E², Ramos-Mozo P¹, Alonso-Organ S¹, Fernández-Arquero M³, López-Farré A¹, Macaya C^{1,2}

Unidad de Investigación Cardiovascular¹ y Unidad Coronaria². Instituto Cardiovascular. Departamento de Inmunología³. Hospital Clínico San Carlos. Madrid

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Analizar si existe alguna asociación entre la resistencia a aspirina (RA) y la presencia de polimorfismos genéticos de un único nucleótido (SNPs) en el gen de la COX-1, así como su relación con modificaciones en la expresión de proteínas plasmáticas en pacientes con enfermedad isquémica estable y tratamiento continuado de aspirina.

Materiales y métodos: Analizamos el proteoma plasmático de 19 pacientes sensibles, 19 resistentes. RA se definió mediante el sistema PFA-100. Se realizó electroforesis bidimensional (IPG 17cm, pH(4-7), geles SDS-PAGE 10%) y tinción con plata. Se analizaron cambios en tres SNPs (A-842G, C22T y C50T) en 50 pacientes sensibles, 33 resistentes y 83 controles mediante PCR a tiempo real.

Resultados: La expresión de cuatro isoformas de α 1-antitripsina estaba aumentada en los pacientes resistentes. No encontramos diferencias en la expresión de ceruloplasmina, precursor de haptoglobina, apolipoproteína AI y precursor de albúmina entre ambos tipos de pacientes. Ningún paciente presentó cambios en el SNP A-842G. La frecuencia de cambio en C22T y C50T fue relativamente baja con respecto a la población total.

Conclusiones: No encontramos asociación entre la presencia de polimorfismos en el gen de la COX-1 y la peor respuesta a la aspirina. Los cambios en observados α 1-antitripsina podrían estar relacionados con un diferente estado inflamatorio entre ambos tipos de pacientes.

Palabras clave:

Resistencia a Aspirina, proteómica, polimorfismos genéticos.

Abstract

Aim: To evaluate the existence of a possible association between Aspirin resistance (AR), COX-1 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and the modifications in the plasma proteome of clinically stable coronary patients.

Materials and methods: AR was defined according to the PFA-100 assay. AR-sensitive and AR-resistant patients had been taken aspirin for the last 9 months. The proteomic study (19 AR-sensitive, 19 AR-resistant) was performed using IPG strips (17cm, pH 4-7), SDS-PAGE gels (10%) and silver staining. We study three SNPs (A-842G, C22T y C50T) in 50 AR-sensitive patients, 33 AR-resistant and 83 controls using a real-time PCR.

Results: The expression of four α 1-antitripsin isoforms was increased in the aspirin-resistant patients. No differences were found in the expression of ceruloplasmin, haptoglobin-precursor, apolipoprotein-AI and albumin-precursor between both groups of patients. The A-842G SNP was undetectable in all subjects. The remaining two SNPs (C22T y C50T) showed a low frequency with respect the global population.

Conclusions: The low SNPs frequencies were unlikely to explain the difference in aspirin responsiveness between both groups of patients. The changes in α 1-antitripsin could be linked with a different inflammatory state in these patients.

Key words:

Aspirin resistance, proteomics, genetic polymorphisms.

Correspondencia

C. Macaya
Unidad de Investigación Cardiovascular. Hospital Clínico San Carlos
Profesor Martín Lagos s/n. Madrid 28040. España
lcarinv.hcsc@salud.madrid.org



Introducción

A lo largo de los años, la aspirina ha demostrado ser un tratamiento muy eficaz en la prevención de los eventos cardiovasculares. De hecho, la aspirina es capaz de reducir hasta un 25% el riesgo de muerte, infarto o accidente cerebrovascular [1-3]. Desafortunadamente, este beneficio no es igual en todos los pacientes, existiendo una elevada proporción de pacientes que a pesar de tomar aspirina siguen sufriendo eventos aterotrombóticos. Aunque hoy en día aún no existe un criterio diagnóstico formal, a esta incapacidad de la aspirina de ejercer correctamente su efecto antiplaquetario se la conoce como «Síndrome de resistencia a la Aspirina».

Se ha estimado que entre un 8% y un 45% de los pacientes son resistentes a este fármaco [4]. Además, diversos estudios han demostrado que la resistencia a la aspirina influye de forma directa en el pronóstico de los pacientes cardiovasculares, mostrando este tipo de pacientes mayor riesgo cardiovascular a largo plazo [5,6].

A nivel molecular, la aspirina ejerce su principal efecto antitrombótico inhibiendo la actividad de la ciclooxigenasa-1 plaquetaria (COX-1) mediante la acetilación de una serina localizada en la posición 529 del sitio catalítico de la COX-1, bloqueando así la síntesis de tromboxano-A₂ (TxA₂) en las plaquetas [7]. Son muy diversos los mecanismos potenciales que se han propuesto para tratar de explicar la resistencia a la aspirina, aunque realmente, el mecanismo por el que ocurre este fenómeno sigue siendo desconocido. Se han descrito factores tanto clínicos como farmacodinámicos y biológicos relacionados con la resistencia a la aspirina [8]. Sin embargo, diversos autores hablan de la posible existencia de variaciones o diferencias a nivel genético como la principal causa de la diferente respuesta de las plaquetas de estos pacientes a la aspirina [9,10].

Entre los posibles factores genéticos implicados en la mejor o peor respuesta a la aspirina existen descritas varias mutaciones y/o polimorfismos en los genes que codifican para la COX-1, COX-2 y la glicoproteína plaquetaria (GP) IIb/IIIa. [11]. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado recientemente la importancia del polimorfismo de la glicoproteína plaquetaria GP IIb/IIIa en el grado de activación de las plaquetas e incluso en la variabilidad del efecto antitrombótico a fármacos como el clopidogrel [12].

Identificar a los pacientes no respondedores a aspirina y alcanzar niveles adecuados de inhibición de sus plaquetas con terapias alternativas tiene interés clínico ya que en la actualidad no disponemos de biomarcadores que nos permitan identificar fácilmente a este tipo de pacientes. Re-

cientemente, nuestro grupo ha descrito mediante proteómica una clara asociación e implicación de algunas proteínas plasmáticas con el fallo de este fármaco en producir la respuesta biológica esperada en este tipo de pacientes. Como continuación a este trabajo, en el presente estudio nos propusimos analizar si existe alguna asociación entre resistencia a la aspirina y la presencia de polimorfismos genéticos de un único nucleótido (SNPs) en el gen de la COX-1, así como su relación con modificaciones en la expresión de proteínas plasmáticas.

Material y métodos

El estudio proteómico se llevó a cabo en un total de 38 pacientes (19 sensibles y 19 resistentes). Para el estudio genético se analizaron 88 pacientes (50 resistentes y 33 sensibles). En ambos casos, se trataba de pacientes con enfermedad isquémica estable sometidos a un tratamiento continuado de 100 mg/día de aspirina. Los pacientes fueron divididos en resistentes y sensibles a aspirina clasificados según el sistema PFA-100 [13]. Los pacientes estuvieron tomando aspirina durante al menos los últimos nueve meses y habían sufrido el evento coronario agudo al menos nueve meses antes de la inclusión en el estudio. Un criterio de exclusión fue el tratamiento con otros fármacos antitrombóticos o antiinflamatorios no esteroideos 30 días antes de la inclusión en el estudio.

Las muestras de sangre fueron obtenidas durante la mañana 2 a 4 horas tras la toma de aspirina mediante punción antecubital. Los primeros 3-4 ml fueron descartados para evitar activación plaquetaria espontánea. Las muestras sanguíneas se recogieron en tubos con citrato tanto para el análisis mediante el sistema PFA-100 y el análisis de polimorfismos genéticos. La muestra de sangre para la obtención de plasma se recogió en un tubo con EDTA.

Todos los pacientes recibieron una dosis adicional de Aspirina (100 mg) y una hora después se obtuvo otra muestra de sangre para desarrollar de nuevo el ensayo PFA-100 y reforzar los resultados obtenidos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos y todos los pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado.

Clasificación de los pacientes sensibles y resistentes a la aspirina

Los pacientes resistentes a aspirina fueron clasificados mediante el empleo del sistema PFA-100 (Dade Behring W. Sacramento, USA) [14]. El sistema PFA-100 se basa en el empleo de cartuchos con una membrana de colágeno tratados con epinefrina (10 µg). La sangre obtenida en citrato es

aspirada por una aguja que somete a la muestra a unas elevadas condiciones de flujo (5000 a 6000 s⁻¹) a través de una pequeña apertura (150 µg) que existe en la membrana de cada uno de los cartuchos. El tiempo necesario para la oclusión de la apertura, definido como «tiempo de taponado» (CT), es un indicador de la función plaquetaria de la muestra sanguínea. De acuerdo con el fabricante del equipo, rangos en el tiempo de taponado comprendidos entre 94 y 193 segundos con cartuchos de epinefrina identifican pacientes resistentes a aspirina [15]. En pacientes sensibles a aspirina los tiempos de taponado de cartuchos con epinefrina son superiores y tras un periodo de 300 segundos el proceso automáticamente se detiene, siendo por lo tanto el límite superior de medida del equipo 300 segundos.

Determinación de Proteína C Reactiva

Se determinó la concentración plasmática de la proteína C reactiva (PCR) en cada uno de los pacientes según las técnicas rutinarias empleadas en nuestro centro.

Electroforesis bidimensional (2-DE)

Se analizó mediante electroforesis bidimensional un total de 500 µg de proteína total presente en el plasma [13]. La primera dimensión se realizó mediante el empleo de tiras IPG con un gradiente de pH inmovilizado de pH 4-7. Mediante la utilización de un equipo para electroforesis bidimensional Protean IEF Cell System (Bio-Rad Labs) se lleva a cabo la primera dimensión [16,17]. En la segunda dimensión, las proteínas presentes en cada gel IPG se resuelven mediante otro paso de electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% mediante el empleo del sistema PROTEAN II XL (Bio-Rad Laboratorios). Los geles se sometieron a un proceso de tinción con plata (Silver-Stain Plus Kit, Bio-Rad Labs).

Adquisición de imagen y análisis

Los geles bidimensionales una vez teñidos se escanearon para su posterior análisis. El escáner empleado para la obtención de la imagen fue un UMAX POWERLOOK III que opera con el programa Magic Scan V 4.5 específico para el escaneo de geles e imágenes bidimensionales. El análisis de las imágenes obtenidas se realizó mediante el empleo de un software específico denominado Quantity-One 4.2.3 de Bio-Rad Laboratories. La intensidad de cada uno de los puntos analizados se procesó mediante el correspondiente método de sustracción o eliminación de fondo, y la intensidad total de cada punto se normalizó con el correspondiente valor de intensidad de la albúmina presente en el mismo gel, es decir, en el mismo paciente [13].

Espectrometría de masas

Los puntos de interés fueron recortados y extraídos manualmente de los geles [16]. Para realizar la identificación de cada uno de los puntos de interés mediante espectrometría de masas, cada punto se sometió a un proceso de reducción en el gel, alquilación, y por último digestión con tripsina [13]. Los análisis llevados a cabo mediante MALDI-TOF MS se desarrollaron en un aparato MALDI-tandem 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, Massachusetts). Todas las masas de los espectros obtenidos fueron calibradas externamente mediante una mezcla de péptidos estándar (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

La identificación de proteínas se realizó mediante comparación con la base de datos MASCOT DATABASE (Mascot database.http:// www.matrixscience.com.).

Estudio de polimorfismos genéticos de la COX-1

Para el estudio de polimorfismos genéticos estudiamos 50 pacientes sensibles y 33 resistentes. Se extrajo ADN genómico procedente de sangre periférica. El genotipado de los pacientes se realizó mediante estudio de diseño TaqMan en un equipo de PCR a tiempo real 7900 HT (Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystem Foster City, CA, USA). Se analizaron tres polimorfismos genéticos de un único nucleótido (SNPs) en el gen de la ciclooxigenasa 1 (COX-1), uno en la región promotora del gen (A-842G): primer forward 5'-TTCCTCCTTCTAGGTGCTTCCT-3', VIC- CTGGC-GAAAAGGAGA, primer reverse 5'-CGCCGAATTTATAGAAATCCCAGCAT-3', FAM-TGGCGAGAAGGAGA, y dos en la región codificante (C22T): primer forward 5'-GCTCAGCCCCTCATCTCTCT-3', VIC-CAAGAACCG-GAGCAAG, primer reverse 5'-GGAGCAGGAGCAGGAACAG-3', FAM-CAAGAACCAGAGCAAG y (C50T): primer forward 5'-CTCCGGTTCTTGCTGTTCT-3', VIC-CTGCTCCCGCCGCT, primer reverse 5'-GGTCCGC-GAGCAGGA-3', FAM-CTGCTCCTGCCGCT.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95° C durante 5 minutos, seguido de la fase cíclica de 35 ciclos a 95° C durante 1 minuto, 60° C durante 30 segundos y 72° C durante 30 segundos; y una última fase de 72° C durante 7 minutos.

Así mismo, también realizamos el genotipado de una población control (n=83), para comparar con nuestra población de estudio.

Análisis estadístico

Los resultados se muestran como media ± error estándar de la media (eem). Para la determinación de significación

estadística realizamos test de Mann-Whitney para el análisis proteómico. En el caso del análisis genético se realizó el test de Chi-cuadrado con el programa Epi Info v. 6.02 (CDC Atlanta USA) para estudiar las diferencias entre los dos grupos de estudio. Se consideraron diferencias significativas a los valores de $p < 0.05$.

Resultados

Estudio del proteoma plasmático

Los 38 pacientes incluidos en el estudio proteómico fueron seleccionados basándonos en el hecho de que los tiempos de oclusión estuviesen en los rangos extremos para cada una de las dos condiciones de respuesta a Aspirina (Tabla 1). Los valores del tiempo de oclusión de cartuchos de epinefrina en el momento de inclusión y una hora tras la toma de una dosis de 100 mg de Aspirina se muestran en la tabla 1. Los pacientes incluidos en el estudio presentaban edad y factores de riesgo similares (Tabla 1), y todos ellos estaban recibiendo un tratamiento farmacológico similar en el momento de inclusión en el estudio.

Una vez obtenido el proteoma plasmático de cada uno de los pacientes, analizamos densitométricamente diferentes proteínas. Algunas proteínas fueron identificadas mediante comparación con los proteomas plasmáticos disponibles en la base de datos SWISS-2D (<http://www.expasy.ch/ch2d>). El análisis densitométrico de cada uno de los puntos se realizó usando el valor de la albúmina como valor normalizador [16]. En trabajos previos, tanto de nuestro grupo como de otros, algunas de las proteínas aquí analizadas han sido identificadas mediante espectrometría de masas y comparación con la base de datos (<http://www.matrixscience.com>) [16,18,19].

Mediante análisis por espectrometría de masas confirmamos la identidad de alguna de las proteínas plasmáticas

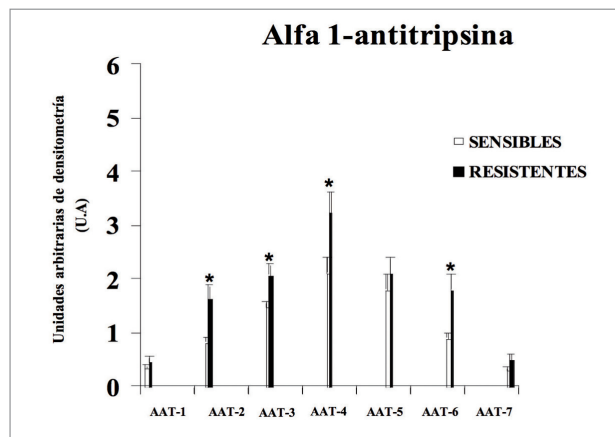


Fig. 1. Expresión de diferentes isoformas de α 1-antitripsina en una población de pacientes sensibles y resistentes a la aspirina. (AAT: α 1-antitripsina; U.A.: Unidades arbitrarias de densitometría. * $p < 0.05$ con respecto a los pacientes sensibles).

analizadas en el estudio: 2 isoformas del precursor de albúmina y dos isoformas de la proteína precursora de haptoglobina (Tabla 3).

En el proteoma plasmático de cada uno de los pacientes analizamos la expresión de varias proteínas relacionadas fundamentalmente con el grado inflamatorio, protección vascular y el estado oxidativo de este tipo de pacientes.

En primer lugar, analizamos la expresión de siete isoformas distintas de α 1-antitripsina (AAT). La expresión de las isoformas 2, 3, 4 y 6 de la AAT estaba aumentada de forma significativa en el plasma de los pacientes resistentes a Aspirina en comparación con los pacientes sensibles a Aspirina (Figura 1).

También analizamos la expresión de dos isoformas distintas del precursor de haptoglobina. No encontramos cambios significativos en la expresión de ninguna de las dos iso-

Tabla 1. Características de los pacientes estudiados mediante proteómica

	Sensibles (n=19)	Resistentes (n=19)	p
EDAD (años)	65 ± 9	66 ± 8	NS
FACTORES DE RIESGO (%)			
Fumadores	32 %	47 %	NS
Hipertensión	37 %	58 %	NS
Hiperlipemia	79 %	68 %	NS
Diabetes Mellitus	10 %	26 %	NS
Tiempo de oclusión en el momento de inclusión	>300	112.9 ± 21.0	-
Tiempo de oclusión una hora tras el tratamiento con Aspirina	>300	124.9 ± 27.1	-

(Media ± DS. NS: no significación estadística, $P > 0.05$).

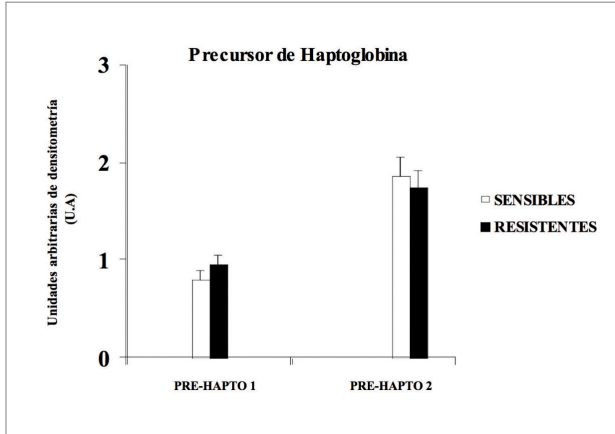


Fig. 2. Expresión de diferentes isoformas del precursor de haptoglobina en una población de pacientes sensibles y resistentes a la aspirina. (PRE-HAPTO: precursor de haptoglobina; U.A.: Unidades arbitrarias de densitometría. * $p < 0.05$ con respecto a los pacientes sensibles).

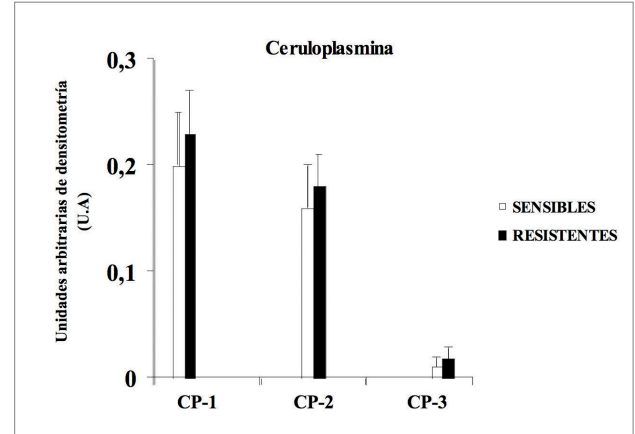


Fig. 3. Expresión de diferentes isoformas de ceruloplasmina en una población de pacientes sensibles y resistentes a la aspirina. (CP: ceruloplasmina; U.A.: Unidades arbitrarias de densitometría. * $p < 0.05$ con respecto a los pacientes sensibles).

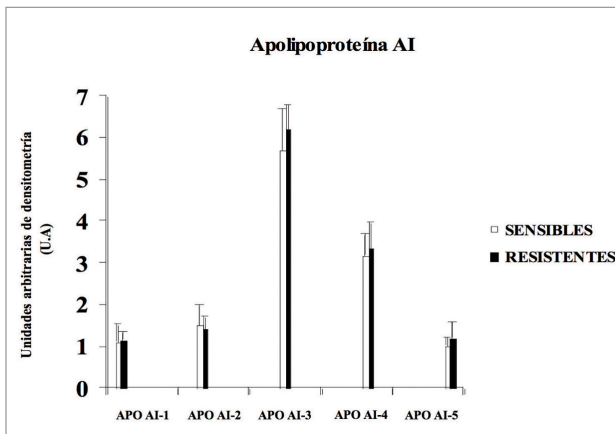


Fig. 4. Expresión de diferentes isoformas de la apolipoproteína-AI en una población de pacientes sensibles y resistentes a la aspirina. (APO AI: apolipoproteína-AI; U.A.: Unidades arbitrarias de densitometría. * $p < 0.05$ con respecto a los pacientes sensibles).

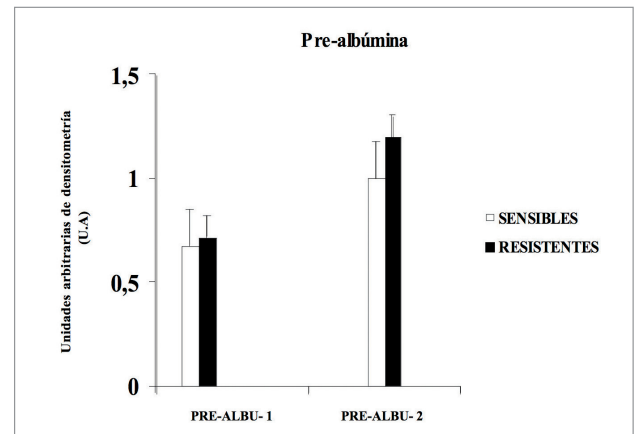


Fig. 5. Expresión de diferentes isoformas del precursor de albúmina en una población de pacientes sensibles y resistentes a la aspirina. (PRE-ALBU: precursor de albúmina; UA: Unidades arbitrarias de densitometría. * $p < 0.05$ con respecto a los pacientes sensibles).

formas (Figura 2). Tampoco encontramos diferencias significativas en el nivel de expresión de tres isoformas distintas de una proteína, identificada mediante comparación con la base de datos SWISS-2D como ceruloplasmina (Figura 3).

Posteriormente, analizamos la expresión de cinco isoformas de la apolipoproteína-AI, cuya expresión fue muy similar entre ambos grupos de pacientes (Figura 4). Por último, la expresión de dos proteínas identificadas como precursor de albúmina fue similar entre ambos grupos de pacientes (Figura 5).

Análisis genético

En la segunda parte de este estudio nos centramos fundamentalmente en el análisis de la presencia de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en el gen de la COX-1 cuya presencia pudiese estar relacionada con cambios en la expresión y actividad de dicho enzima. Es importante destacar, que al igual que en el estudio proteómico, los pacientes fueron seleccionados basándonos en el hecho de que los tiempos de oclusión estuviesen en los rangos extremos para cada una de las dos condiciones de respuesta a Aspirina (Tabla 1).

Tabla 2. Análisis de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) (% pacientes)

SNPs	HAPLOTIPOS	SENSIBLES	RESISTENTES	CONTROLES
TOTAL PACIENTES	-	50	33	83
NO POLIMÓRFICOS	ACC y ACC	44 (88%)	29 (87.8%)	69 (82.1 %)
C22T	ACC y ATC	3 (6.8%)	1 (3.4%)	7 (8.3 %)
C50T	ACC y ACT	3 (6.8%)	3 (10.3%)	7 (8.3 %)
C22T/ C50T	ACC y ATT	0	0	0
A-842G	ACC y GCC	0	0	0
A-842G/ C22T	ACC y GTC	0	0	0
A-842G/ C50T	ACC y GCT	0	0	0
A-842G/ C22T/ C50T	ACC y GTT	0	0	0

(NO POLIMÓRFICOS: individuos que no presentaron cambios en ninguno de los tres SNPs analizados (A-842G; C22T; C50T).

Tabla 3. Identificación del precursor de albúmina y el precursor de haptoglobina por espectrometría de masas

Proteína	Nº acceso base de datos	Método de identificación	Secuencia cubierta (%)	Baremo (%)
Precursor de Albúmina (PRE-HAPTO)				
PRE-HAPTO Isoforma 1	P02768	MS	16%	97.90
PRE-HAPTO Isoforma 2	P02768	MS	22	100
Precursor de Haptoglobina (PRE-HAPTO)				
PRE-HAPTO Isoforma 1	P00738	MS/MS	3%	74.40
PRE-HAPTO isoforma 2	P00738	MS/MS	7%	98.64

(MS: análisis mediante espectrometría de masas; MS/MS: Espectrometría de masas en tandem).

Analizamos la presencia cambios en tres SNPs en el gen de la COX-1 (A-842G, C22T Y C50T) (Figura 6) en una población compuesta por 50 pacientes sensibles a aspirina, 33 pacientes resistentes y una población control formada por 83 individuos del área de la Comunidad de Madrid, como representación de lo que puede ocurrir en la población española.

La tabla 2 muestra los distintos haplotipos analizados a partir de la combinación de los tres polimorfismos estudiados. Como se puede observar, nuestra población se caracterizó fundamentalmente por la baja frecuencia de polimorfismos en los tres grupos de pacientes analizados.

No observamos ningún individuo en nuestra población que presentara cambio de adenina (A) por guanina (G) en el caso del SNP-1 (A-842G) (Tabla 2). En el caso del SNP-2 (C22T) observamos como la presencia de este polimorfismo era mayor en los pacientes sensibles a la aspirina con respecto a los resistentes (6,8 % vs 3,4 %), aunque este porcentaje fue insignificante respecto a la población total (Tabla 2).

Respecto al tercer polimorfismo estudiado, SNP-3 (C50T), observamos una mayor presencia de este polimor-

fismo en los pacientes resistentes con respecto a los sensibles, aunque únicamente se trató de un 10,3 % en los pacientes resistentes con respecto a la población resistente total, que no presentaron cambio en ese polimorfismo.

Por lo tanto, no encontramos ninguna asociación entre resistencia/sensibilidad a la aspirina y la presencia de los tres polimorfismos de un único nucleótido analizados en el gen de la COX-1. La baja presencia de estos SNPs en nuestra población no explicaría la elevada incidencia de este síndrome (Figura 7).

Discusión

En la primera parte de este estudio, analizamos mediante proteómica, cambios en la expresión de proteínas plasmáticas relacionadas principalmente con la inflamación y el estrés oxidativo en pacientes con enfermedad coronaria estable sensibles y resistentes a Aspirina, que pudieran estar asociados con la diferente funcionalidad de sus plaquetas. Recientemente, nuestro grupo ha descrito en este mismo grupo de pacientes, la existencia de diferencias en el nivel de expresión de algunas proteínas plasmáticas, que parecen

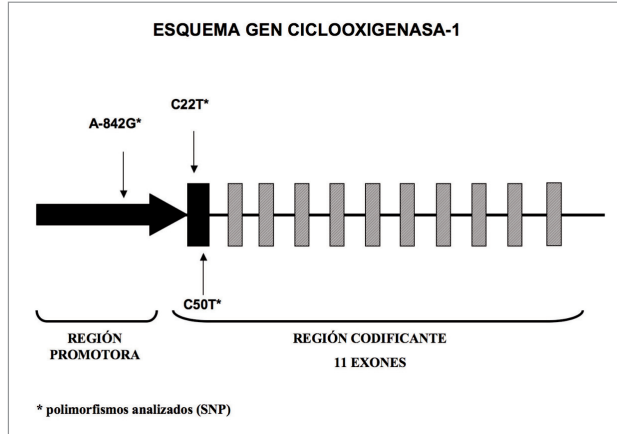


Fig. 6. Localización de los tres SNPs analizados en el estudio. El SNP-1 (A-842G) se encuentra localizado en la región promotora del gen; SNP-2 (C22T) y SNP-3 (C50T) se localizan la región codificante (exón 1) del gen de la COX.

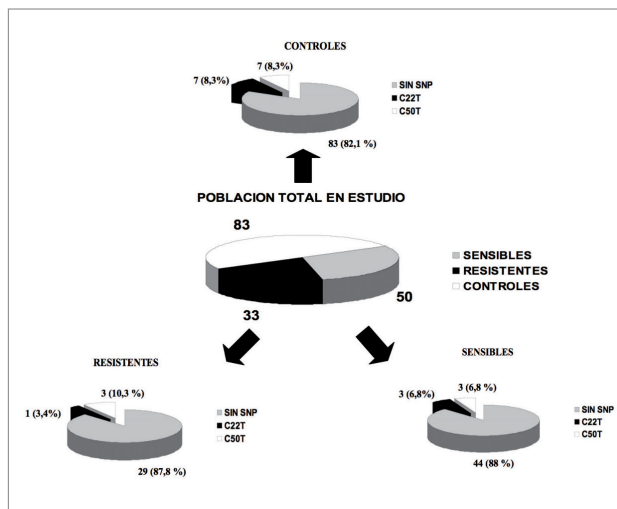


Fig. 7. Frecuencia polimórfica del gen de la COX-1 en la población representativa de la Comunidad de Madrid. Ningún caso presentó el SNP-1 (A-842G).

estar relacionadas de forma muy directa con la resistencia a la aspirina [13].

Hemos identificado y estudiado la expresión de diferentes isoformas de tres importantes proteínas de fase aguda como son la α 1-antitripsina, el precursor de haptoglobina y la ceruloplasmina, para analizar su posible utilidad como indicadores o marcadores bioquímicos que ayuden a la identificación de pacientes resistentes a la acción antiplaquetaria de la Aspirina. En primer lugar, observamos como la expresión de cuatro de las siete isoformas de la α 1-antitrip-

sina estaba aumentada de forma significativa en los pacientes resistentes con respecto a los sensibles. En esta misma línea, los niveles de esta proteína estaban también aumentados en el plasma de pacientes durante la fase aguda de un síndrome coronario agudo [16]. Sin embargo, no encontramos cambios significativos en la expresión de ceruloplasmina y del precursor de haptoglobina entre los pacientes sensibles y resistentes a aspirina. Ambas proteínas están relacionadas de forma muy directa con la inflamación y el estado oxidativo [20,21]. Sin embargo, el papel y la posible implicación de estas proteínas en los eventos cardiovasculares aún no están completamente definida, aunque sí que se ha observado una estrecha correlación entre los niveles de expresión de estas proteínas de fase aguda y las concentraciones plasmáticas de PCR [22]. En este sentido, tampoco encontramos diferencias significativas en la concentración plasmática de PCR entre ambos grupos de pacientes (0.24 ± 0.03 mg/dl vs 0.22 ± 0.04 mg/dl).

No obstante, es importante destacar que en resultados anteriores de nuestro grupo observamos como la expresión de tres isoformas haptoglobina estaban aumentadas de forma significativa en el grupo pacientes resistentes [16]. Posiblemente, no hemos encontrado diferencias en la expresión del precursor de haptoglobina por tratarse de una molécula en un estadio funcional anterior al de la proteína final. Estos resultados y junto con los obtenidos en estudios anteriores muestran como, tal vez, el diferente nivel o grado de expresión de algunas de las proteínas definidas habitualmente como de fase aguda podría estar asociada con la peor respuesta plaquetaria a la aspirina que muestran este tipo de pacientes.

En este estudio, también identificamos 5 isoformas de la Apo-AI. Múltiples estudios atribuyen los efectos beneficiosos de las lipoproteínas de alta densidad a esta proteína. De hecho, la expresión de esta proteína se ha asociado con una mayor protección vascular [23,24]. Sin embargo, no encontramos cambios significativos en la expresión de ninguna de las isoformas de la Apo-AI entre los pacientes sensibles y resistentes a aspirina. Del mismo modo, tampoco se encontraron cambios significativos en la expresión de otra apolipoproteína asociada a la protección vascular, la apolipoproteína-AIV, en este mismo tipo de pacientes [16]. Teniendo en cuenta estos resultados, podríamos decir que no parecen existir diferencias, en cuanto a daño vascular, asociadas con la mejor o peor respuesta plaquetaria a la aspirina de ambos grupos de pacientes.

Por último, tampoco encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de dos isoformas del precursor de albúmina, un marcador nutricional [25], sugiriendo



un estado nutricional similar entre ambos grupos de pacientes. En la misma línea, tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de otra isoforma del precursor de albúmina, descrito en el primer estudio proteómico realizado con estos mismos pacientes.

Por otro lado, analizamos el gen de la COX-1 en búsqueda de posibles polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) que pudieran estar asociados con la heterogeneidad en la respuesta plaquetaria a la aspirina en una población de pacientes con enfermedad isquémica establecida. En este sentido, la presencia de un SNP que conlleve cambio de aminoácido en el gen de la COX-1 podría alterar la actividad catalítica o la afinidad de este enzima por la aspirina. Así mismo, la presencia de SNPs en las regiones limítrofes exón-intrón puede influir de forma muy directa en el splicing del m-RNA del enzima. En este estudio analizamos la frecuencia de SNPs en el gen de la COX-1 tanto en la región promotora (A-842G), como en la región codificante (C22T y C50T) que pudieran estar asociados con la diferente respuesta plaquetaria que muestran este tipo de pacientes a la aspirina.

Nuestros resultados muestran que la frecuencia de estos SNPs es relativamente baja en nuestra población, comparado con los resultados obtenidos en otras poblaciones como la caucasiana o afroamericana [26], y sólo explicarían la peor respuesta a la aspirina en un pequeño porcentaje de la población. Por lo tanto, no encontramos ninguna asociación entre la mejor o peor respuesta plaquetaria a la aspirina y la presencia de los tres SNPs analizados.

Es importante destacar, que existe una gran controversia con respecto a la relevancia de la presencia de mutaciones en el gen de la COX-1 sobre la mejor o peor respuesta plaquetaria a la aspirina. En este sentido, Maree et al [27] demostraron que la existencia de polimorfismos en la región promotora del gen de la COX-1 (842G) estaba asociado a la resistencia a la aspirina [28]. Por otro lado, Halushka et al [11] mostraron como pacientes heterocigotos para el SNP C50T, mostraban una mayor inhibición de la formación de tromboxano por la aspirina. Sin embargo, Hillarp et al [28] tampoco encontraron SNPs en el gen de la COX-1 en pacientes no respondedores que habían sufrido un evento isquémico cerebral. En la misma línea de resultados, Takahashi et al [29] tampoco observaron ninguna asociación entre la presencia de polimorfismos en el gen de la COX-1 y COX-2 y la peor respuesta a la aspirina que sirviera para explicar la alta incidencia de este síndrome en la población general.

Por lo tanto, serán necesarios más estudios tanto genéticos como proteómicos que proporcionen más información

sobre los posiblemente mecanismos y vías de acción implicadas en la diferente respuesta plaquetaria al tratamiento con aspirina. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García-Dorado D, Theroux P, Tornos P, Sambola A, Oliveras J, Santos M et al. Previous aspirin use may attenuate the severity of the manifestation of acute ischemic syndromes. *Circulation* 1995; 92: 1743-8.
2. Patrono C, García-Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2373-83.
3. Aspirin Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy. I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994; 308: 81-106.
4. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *JACC* 2005; 46: 1705-9
5. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105:1650-55.
6. Mason PJ, Jacobs AK, Freeman JE. Aspirin resistance and atherothrombotic disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:986-93.
7. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res* 2003; 110:255-8.
8. Goodman T, Sharma P, Ferro A. The genetics of aspirin resistance. *Int J Clin Pract* 2007; 61:826-34.
9. Jefferson BK, Foster JH, McCarthy JJ, Ginsburg G, Parker A, Kottke-Marchant K, et al. Aspirin resistance and a single gene. *Am J Cardiol* 2005; 95:805-8.
10. Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 2006; 27:647-54.
11. Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Pharmacogenetics and genomics. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2002; 73:122-30.
12. Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Sabaté M, Fernandez C, et al. PIA polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation. *Blood Coagul Fibrinol* 2004; 15:1-5.



13. López-Farré AJ, Mateos-Cáceres PJ, Sacristán D, Azcona L, Bernardo E, de Prada TP, et al. Relationship between vitamin D binding protein and aspirin resistance in coronary ischemic patients: a proteomic study. *J Proteome Res* 2007; 6:2481-7.
14. Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Sabate M, Jiménez-Quevedo P, et al. Insulin therapy is associated with platelet dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus on dual oral antiplatelet treatment. *Am J Cardiol* 2006; 97:38-43.
15. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2001; 88:230-5.
16. Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López-Farré A, Macaya C, Nuñez A, Gomez J, et al. Proteomic analysis of plasma patients during an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1578-83.
17. Alonso-Orgaz S, Moreno L, Macaya C, Rico L, Mateos-Cáceres PJ, Sacristan D, et al. Proteomic study of plasma from moderate hypercholesterolemic patients. *J Proteome Res* 2006; 5:2301-8.
18. Sinz A, Bantscheff M, Mikkat S, Ringel B, Drynda S, Kew J, et al. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. *Electrophoresis* 2002; 23:3445-56.
19. Choi J, Malakowsky CA, Talent JM, Conrad CC, Gracy RW. Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293:1566-70.
20. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996; 42:1589-600.
21. Fox PL, Mukhopadhyay C, Ehrenwald E. Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Sci* 1995; 56:1749-58.
22. Brunetti ND, Correale M, Pellegrino PL, Cuculo A, Biase MD. Acute phase proteins in patients with acute coronary syndrome: Correlations with diagnosis, clinical features, and angiographic findings. *Eur J Intern Med* 2007; 18:109-17.
23. Ramet ME, Ramet M, Lu Q, Nickerson M, Savolainen MJ, Malzone A, et al. High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:2288-97.
24. Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, Caillaud JM, Viglietta C, Castro G et al. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation* 1996; 94:713-7.
25. Walsh D, Mahmoud F, Barna B. Assessment of nutritional status and prognosis in advanced cancer: interleukin-6, C-reactive protein, and the prognostic and inflammatory nutritional index. *Support Care Cancer* 2003; 11:60-2.
26. Ulrich CM, Bigler J, Sibert J, Greene EA, Sparks R, Carlson CS, et al. Cyclooxygenase 1 (COX1) polymorphisms in African-American and Caucasian populations. *Hum Mutat* 2002; 20:409-10.
27. Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, Dolan C, Cox D, O'Brien J, et al. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *J Thromb Haemost* 2005; 3:2340-5.
28. Hillarp A, Palmqvist B, Lethagen S, Villoutreix BO, Mattiasson I. Mutations within the cyclooxygenase-1 gene in aspirin nonresponders with recurrence of stroke. *Thromb Res* 2003; 112:275-83.
29. Takahashi S, Ushida M, Komine R, Shimodaira A, Uchida T, Ishihara H, et al. Platelet responsiveness to in vitro aspirin is independent of COX-1 and COX-2 protein levels and polymorphisms. *Thromb Res* 2008; 121:509-17.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.

ORIGINAL

Efecto de la LDL modificada en la expresión de adipofilina en macrófagos y células musculares lisas de la pared vascular. Implicaciones para el desarrollo de arteriosclerosis

Effect of modified LDL in the expression of adipocyte differentiation-related protein in macrophages and vascular smooth muscle cells. Implications for atherosclerosis progression

Llorente-Cortés V¹, Royo T³, Juan-Babot O¹, Badimon L^{1,2}

¹ Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC. Hospital de la Santa Creu I Sant Pau. ² CIBEROBN. Instituto de Salud Carlos III.

³ Departamento de Biología Celular. Universidad de Barcelona.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE.

Resumen

Objetivo: Analizar si la unión e interiorización de la LDL modificada por agregación (LDLag) puede inducir la expresión de la proteína adipofilina (ADRP), un marcador de acumulación lipídica, en las células musculares lisas de la pared vascular (CMLV) y macrófagos humanos.

Resultados: La LDLag induce la sobreexpresión de ADRP tanto a nivel de ARNm (PCR tiempo real) como a nivel de proteína («western blot») en CMLV (ARNm: 3.06-veces; proteína: 8.58-veces) y también en macrófagos (ARNm: 3.5-veces; proteína: 3.71-veces). Los estudios inmunohistoquímicos evidenciaron una alta colocalización entre ADRP y CMLV y también entre ADRP y macrófagos en placas ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido.

Conclusiones: La captación de LDLag mediante el receptor lipoproteico LRP1 juega un papel primordial en la formación de células espumosas a partir de macrófagos y de CMLV y, por tanto, en la progresión de la lesión aterosclerótica.

Palabras clave:

Adipofilina, LDL agregada, LRP1, células musculares lisas de pared vascular, macrófagos.

Abstract

Aims: The objectives of this work were to analyze whether aggregated LDL (agLDL) uptake modulates ADRP expression levels in human vascular smooth muscle cells (VSMC) and macrophages (HMDM).

Methods and Results: AgLDL strongly upregulated ADRP mRNA (Real-time PCR) and protein expression (western blot) in human VSMC (mRNA: by 3.06-fold; protein: 8.58-fold) and HMDM (mRNA: by 3.5-fold; protein: by 3.71-fold). Immunohistochemical studies evidence a high colocalization between ADRP/macrophages and ADRP/VSMC in advanced lipid-enriched atherosclerotic plaques.

Conclusions: These results demonstrate that agLDL-LRP1 engagement induces ADRP overexpression in both HMDM and human VSMC. ADRP is highly expressed in advanced lipid-enriched human atherosclerotic plaques. Therefore, LRP1-mediated agLDL uptake might play a pivotal role on vascular foam cell formation and atherosclerotic plaque progression.

Key words:

Aggregated LDL, LRP1, adipophilin, human VSMC, macrophages.

Correspondencia

V. Llorente Cortés
Científico titular CSIC
Instituto Catalán Ciencias Cardiovasculares
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona
cllorente@csic-iccc.org

Introducción

Uno de los eventos principales en el proceso aterogénico es la acumulación de lípidos, principalmente colesterol esterificado en el espacio subendotelial de la pared vascular [1-3]. *In vivo*, la LDL retenida en la pared vascular sufre modificaciones tales como la oxidación, pero sobre todo agregación y fusión [4,5]. De hecho, la mayor parte de la LDL retenida en la pared vascular se ha encontrado en forma agregada (LDLag). La LDLag es un inductor muy potente de acumulación intracelular de colesterol esterificado tanto en los macrófagos [6-8] como en las células musculares lisas de la pared vascular (CMLV) [9-11]. En CMLV, el receptor lipoproteico «*Low density lipoprotein receptor-related protein*» (LRP1), es clave para la acumulación lipídica intracelular en células vasculares ya que facilita la captación de LDLag de forma no regulada por el colesterol [11,12]. El mecanismo de internalización de LDLag por el LRP1 está favorecido en la íntima arterial, donde los proteoglicanos facilitan los procesos de modificación por agregación e internalización de la LDL [13]. La expresión del LRP1, a diferencia de la del receptor de LDL, se regula a la alza por la LDLag *in vitro* y por la hipercolesterolemia en el modelo porcino [14,15]. Por consiguiente, el LRP1 por tener un papel crucial en la formación de células espumosas en la pared vascular, podría contribuir de forma decisiva a la formación de placas ateroscleróticas «blandas», es decir con un alto contenido en lípido, cuya ruptura se asocia a la mayor parte de los síndromes coronarios agudos (angina inestable, infarto de miocardio y muerte súbita). Por ello resulta de un gran interés conocer los procesos que permiten la acumulación intracelular de lípido a partir de la captación de LDLag mediada por LRP1.

Se ha descrito que las alteraciones en la expresión de adipofilina están asociadas al síndrome metabólico [16,17]. La adipofilina se considera un marcador de acumulación lipídica en diferentes tipos celulares y en diferentes procesos patógenicos relacionados con la acumulación lipídica intracelular [18]. Además esta proteína se encuentra localizada en la superficie de los dropletos lipídicos y juega un papel fundamental en la formación de los mismos [19]. Se considera que la distribución celular tan amplia de la adipofilina se debe a que juega un papel esencial en el metabolismo lipídico, desde el empaquetamiento de los lípidos hasta la regulación de su hidrólisis. En concreto, se ha descrito que la adipofilina incrementa la acumulación lipídica en macrófagos THP-1 y que este aumento previene el eflujo de lípido en estas células [20].

Aunque sabemos que la captación de LDLag mediante LRP1 conduce a una acumulación intracelular de colesterol esterificado muy elevada tanto en macrófago [6-8] como en

la célula muscular lisa [9-11], se desconoce la forma en que se acumula intracelularmente. Los objetivos de este trabajo han sido investigar el efecto de LDLag en la expresión de ARN mensajero y proteína de adipofilina en CMLV y macrófagos, y la posible relación entre los niveles de expresión del LRP1 y los de adipofilina. Nuestros resultados demuestran 1) que existe un alto grado de colocalización entre ADRP y macrófagos y entre ADRP y CMLV en lesiones ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido; 2) que la LDLag induce la expresión de ADRP tanto a nivel de ARNm como de proteína en CMLV y en macrófagos. Dado que la adipofilina está altamente expresada en dos de los tipos celulares claves en el desarrollo de lesión aterosclerótica, la captación de LDLag mediada por LRP1 probablemente juega un papel primordial en la formación de célula espumosa asociada a la progresión de las lesiones ateroscleróticas.

Material y Métodos

Aislamiento y caracterización de células musculares lisas de pared vascular humana

Los cultivos primarios de células musculares lisas de pared vascular (CMLV) humana se obtuvieron a partir de las coronarias procedentes de los corazones extraídos a los individuos transplantados en la Unidad de Trasplantes de Corazón (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau). Las CMLV se obtuvieron por una modificación de la técnica de explantes previamente descrita en nuestro grupo [1-3]. Las CMLV de los explantes se dejaron crecer en monocapa en medio 199 con suero bovino fetal al 20%, suero humano al 2%, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Las CMLV se utilizaron para realizar los experimentos cuando estaban entre pasaje 2 y 6. La viabilidad celular se determinó mediante el método de exclusión por azul de tripano.

Aislamiento de monocitos humanos y diferenciación de macrófagos

Los monocitos se obtuvieron a partir de «*buffy-coats*» (35-40 mL) de sujetos sanos. Las células se depositaron en 15 mL de Ficoll-Hypaque y se centrifugaron a 400 g durante 40 minutos a 22 °C. Las células mononucleadas se obtuvieron a partir de la banda central blanca del gradiente. Las células se lavaron exhaustivamente en DPBS y se resuspendieron en medio RPMI suplementado con un 20% de suero humano A/B. Los monocitos se diferenciaron a macrófagos por adición al medio completo de suero humano A/B al 20% y «*macrophage colony stimulating factor*» (M-CSF) a 100 ng/mL durante 3 días.

Obtención, caracterización y modificación de las lipoproteínas

Las LDL humanas se obtuvieron a partir de una mezcla de sueros procedentes de voluntarios normolipémicos y se aislaron por ultracentrifugación secuencial. La LDL se dializaron y se determinó su concentración en proteína y colesterol. La pureza de la LDL se analizó por electroforesis en gel de agarosa. Las LDL se agregaron in vitro mediante agitación intensa en vortex durante 4 minutos de una solución de LDL de 1 mg/mL [1-3]. El nivel de agregación se comprobó por turbidimetría (absorbancia a 680 m). Para determinar el grado de oxidación se analizó la concentración de sustancias reactivas con el ácido tiobarbúrico (TBARS).

Determinación de la concentración intracelular de colesterol libre (CL) y colesterol esterificado (CE) derivado de LDL

Se indujo la quiescencia de las CMLV y posteriormente se incubaron durante 18 horas con LDL nativa o LDLag. Se realizó la extracción lipídica de las muestras y se separó CL y CE por cromatografía en capa fina. Las bandas correspondientes a CL y CE se cuantificaron densitométricamente utilizando una curva estándar de CL y palmitato de colesterol, respectivamente [1-3]. Los resultados se normalizaron por proteína.

Análisis de la expresión de ARNm de adipofilina y LRP1 por PCR tiempo real

Se sintetizó el cDNA a partir de 1 µg de RNA en una reacción que contenía 0,02 µg/ul de oligodT, 20 U RNAsin, 1 mM dNTPs, 20 mM DTT, 200 U M-MLV-RT, 50 mM Tris-HCl PH 8,3, 75 mM KCl y 3 mM MgCl₂. La reacción se realizó en una hora a 37 °C y se detuvo calentando a 75 °C durante 10 min. El cDNA se diluyó y las distintas alícuotas se utilizaron mediante la utilización de los oligonucleótidos adecuados, para amplificar el RNA de interés. La cuantificación a tiempo real se basa en la utilización de sondas Taqman marcadas con fluorescencia y cebadores específicos diseñados por el «*software Primer Express*» (PE Biosystems). La reacción de amplificación contenía 2 ul de cDNA en 25 ml de «*Taqman PCR master mix*» con 300 nM de cebadores y 250 nM de sonda. El ciclo umbral (Ct) se normalizó por gapdh y se utilizó para el cálculo de la concentración del gen [4].

Análisis de la expresión proteica de adipofilina y LRP1 mediante «Western blot»

Se cargaron 20-30 µg de proteína por pocillo y se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida transfiriéndose a filtros de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anticuerpos anti-LRP1 o anti-adipofilina. La

detección de la proteína se realizó mediante un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y el sistema de detección de supersignal [4].

Immunohistoquímica

Arterias coronarias humanas se obtuvieron a partir de los corazones explantados inmediatamente después de la cirugía. Todos los procedimientos utilizados fueron aprobados por el Comité de Etica y Revisión Institucional. Las muestras embebidas en parafina se cortaron en secciones seriadas de 5 micras de grosor y se colocaron en trozos envueltos con polilisina, después se desparafinaron y se tiñeron con la tinción de tricrómico de mason o se procesaron para inmunohistoquímica. Las lesiones se caracterizaron utilizando las secciones teñidas con tricromico de Mason y se clasificaron de acuerdo con el criterio de la «*American Heart Association*» [21].

Brevemente, las secciones consecutivas se desparafinaron, se hidrataron y se bloquearon. Se aplicó el método de doble inmunofluorescencia. Los anticuerpos primarios fueron: anticuerpo monoclonal anti- α -actina (α -SMC, clon 1A4, Dako); anticuerpo monoclonal anti-macrófago, (CD68, EBM11, Dako) y anticuerpo policlonal anti-ADRP (Research Diagnostics RDI-PROGP40) durante 2 horas (dilución 1:100) a temperatura ambiente. Después de varios lavados, las secciones se incubaron con inmunoglobulinas TRITC anti-ratón (T1659; Sigma) e inmunoglobulinas FITC anticerdo (106-095-006; Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora (dilución 1:50). Las secciones se analizaron en un microscopio Nikon Eclipse 80i. Las imágenes se capturaron mediante el programa Visilog 5.4 Noesis. Se corrieron controles para cada grupo de experimentos.

Resultados

Análisis de la expresión de adipofilina en células musculares lisas y macrófagos de lesiones ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido

La figura 1 muestra una lesión aterosclerótica avanzada tipo V clasificada de acuerdo con la *American Heart Association*. La tinción inmunohistoquímica para CD68 (marcador de macrófagos) y adipofilina demostró un alto grado de colocalización entre la adipofilina (en verde) y el CD68 (en rojo). También se observó un alto grado de colocalización entre la adipofilina (en verde) y la α -actina (marcador de células musculares lisas). Por lo tanto, la adipofilina colocaliza con ambos tipos celulares de la vasculatura, los macrófagos y las células musculares lisas en lesiones ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido (n=3).

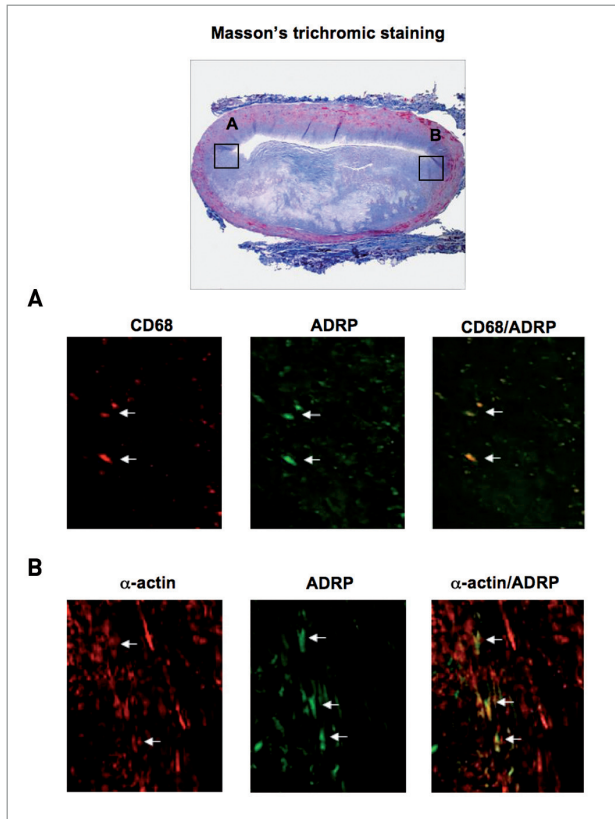


Fig. 1. Análisis de la colocalización entre la proteína ADRP y macrófagos y entre ADRP y CMLV de la pared vascular. Colocalización de ADRP (en verde) y CD68 (en rojo) (A) y colocalización de ADRP (en verde) y α -actina (en rojo) (B) en una lesión ateroesclerótica tipo V (tinción de tricrómico de Mason). Bar: 100 μ M. Las flechas muestran un alto grado de colocalización entre ADRP y células positivas para CD68 (macrófagos) y también entre ADRP y células positivas para α -actina (CMLV).

Efecto de la LDL no modificada y de la LDL modificada por agregación en la acumulación de colesterol esterificado y en la expresión de los receptores lipoproteicos LRP1, LDLR, CD36 y ABCA1 en macrófagos y células musculares lisas de la pared vascular

Por cromatografía en capa fina, se determinó el efecto de la LDL no modificada y de la LDL modificada por agregación en la acumulación intracelular de colesterol esterificado. Existe una diferencia muy importante en la acumulación lipídica inducida por un tipo u otro de lipoproteína en ambos tipos celulares (Tabla 1). La LDL modificada por agregación (100 μ g/mL; 24 horas) indujo una elevada concentración de colesterol esterificado desde niveles indetectables hasta 77,09 \pm 1,2 μ g/mg proteína en macrófagos y hasta

75 \pm 3 μ g/mg proteína en CMLV. En cambio la LDL no modificada indujo una alteración significativa pero leve de la concentración intracelular de colesterol esterificado, hasta 10,25 \pm 0,54 μ g/mg proteína en macrófagos y hasta 25,42 \pm 2,24 μ g/mg proteína en células musculares lisas durante el mismo tiempo de exposición.

Por PCR tiempo real, se analizó la expresión ARNm de los genes LRP1, LDLR, CD36 y ABCA1 en células musculares lisas y macrófagos (Tabla 1). El receptor LDL se redujo de forma muy importante por ambas LDL no modificadas y modificadas por agregación en los dos tipos celulares. En contraste, la expresión en ARNm de LRP1 no se reguló por LDLs en macrófagos y se reguló significativamente a la alza en células musculares lisas vasculares (nLDL: 1,69 \pm 0,31-veces versus agLDL: 2,70 \pm 0,25-veces en 48 horas de incubación), como se ha descrito previamente [14]. El receptor scavenger CD36 no se modificó significativamente por ninguno de los tipos de LDL ni en macrófagos ni en células musculares lisas de pared vascular. Sorprendentemente, la expresión de ARNm del gen ABCA1 se reguló a la alza por agLDL tanto en macrófagos (1,34 \pm 0,10 veces a las 24 horas, 1,67 \pm 0,04 veces a las 48 horas) como en CMLV (1,38 \pm 0,18 veces a las 24 horas, 1,40 \pm 0,11 veces a las 48 horas).

Efecto de la LDL modificada por agregación en la expresión en ARNm y proteína del gen de adipofilina en macrófagos y células musculares lisas de la pared vascular

La LDL modificada por agregación demostró una alta capacidad para inducir la overexpresión de adipofilina en macrófagos (2,67 veces a las seis horas; 3,06 veces a las 12 horas) (Figura 2). En células musculares lisas de la pared vascular, la LDL modificada por agregación también indujo de forma muy importante la expresión de ARNm de adipofilina pero a tiempos de exposición mas largos (1,36 veces a las doce horas; 3,50 veces a las 24 horas) (Figura 2). La regulación a la alza de la adipofilina en los dos tipos celulares se mantuvo a lo largo del tiempo. En contraste, la expresión de ARNm de la adipofilina aumentó solo ligeramente por LDL no modificada tanto en macrófagos (1,6 veces a las 24 horas) como en células musculares lisas de la pared vascular (1,68 veces a las 24 horas).

La expresión de proteína de adipofilina también se reguló de forma muy importante por LDL modificada por agregación (100 μ g/mL, 24 horas) en macrófagos (8,58 veces) y células musculares lisas vasculares (3,71 veces) (Figura 3). Sin embargo, la LDL no modificada apenas alteró los niveles de proteína de adipofilina en estas células (macrófagos: 1,84 veces; musculares lisas: 2,11 veces). En concordancia

Tabla 1. Acumulación intracelular de colesterol esterificado (CE) y niveles de expresión de ARNm de LRP1,LDLR, CD36 y ABCA1 en macrófagos y CMLV

Macrófagos

tiempo (horas)	24			48		
	Control	LDLn	LDLag	Control	LDLn	LDLag
Acumulación CE	No detectable	10.25 ± 0,54 *	77.09 ± 1.2 *†	No detectable	11.54 ± 1,98 *	100.4 ± 2.3 *†
ARNm LRP1	1±0	1.11 ± 0	1.04 ± 0.045	1 ± 0	1.0 ± 0.13	1.02 ± 0.10
ARNm LDLR	1±0	0.12 ± 0.01 *	0.042 ± 0.07*†	1 ± 0	0.068 ± 0.03*	0.050 ± 0,009*†
ARNm CD36	1±0	1.06 ± 0.06	1.16 ± 0.1	1 ± 0	0.89 ± 0.1	0.98 ± 0,04
ARNm ABCA1	1±0	0.98 ± 0.15	1.34 ± 0.10*†	1 ± 0	1.29 ± 0.17	1.67 ± 0,04*†

CMLV

tiempo (horas)	24			48		
	Control	LDLn	LDLag	Control	LDLn	LDLag
Acumulación CE	nodetectable	25.42 ± 2.24 *	75 ± 3 *†	nodetectable	26.35 ± 1.20 *	95 ± 2.5 *†
ARNm LRP1	1±0	1.50 ± 0.35 *	2.20 ± 0.30 *†	1 ± 0	1.69 ± 0.31*	2.70 ± 0.25*†
ARNm LDLR	1±0	0.15 ± 0.02 *	0.16 ± 0.05*	1 ± 0	0.16± 0.04*	0.25 ± 0.02*
ARNm CD36	1±0	0.92 ± 0.03	0.89 ± 0.018	1 ± 0	0.87± 0.03	0.97 ± 0.02
ARNm ABCA1	1±0	0.97 ± 0.07	1.38 ± 0.18*†	1 ± 0	1.11± 0.08	1.40 ± 0.11*†

Los macrófagos y las CMLV se incubaron en ausencia o presencia de LDLn o LDLag (100 µg/mL) durante 24 o 48 horas. Al final de este periodo, la concentración intracelular de colesterol esterificado (CE) se analizó por cromatografía en capa fina después de realizar la extracción lipídica. Los niveles de expresión de LRP1, LDLR, CD36 y ABCA1 se analizaron por PCR a tiempo real como se describe en Métodos. Los resultados de acumulación de CE se expresaron en microgramos de CE por mg de proteína. Los niveles de ARNm de los diferentes genes se expresaron en unidades arbitrarias y se normalizaron utilizando como control endógeno la gapdh para CMLV y 18sRNA para macrófagos. Los resultados se muestran como la media ± SEM de tres experimentos realizados en duplicado. * P<0.05 vs células control, † P<0.05 vs células expuestas a LDLn.

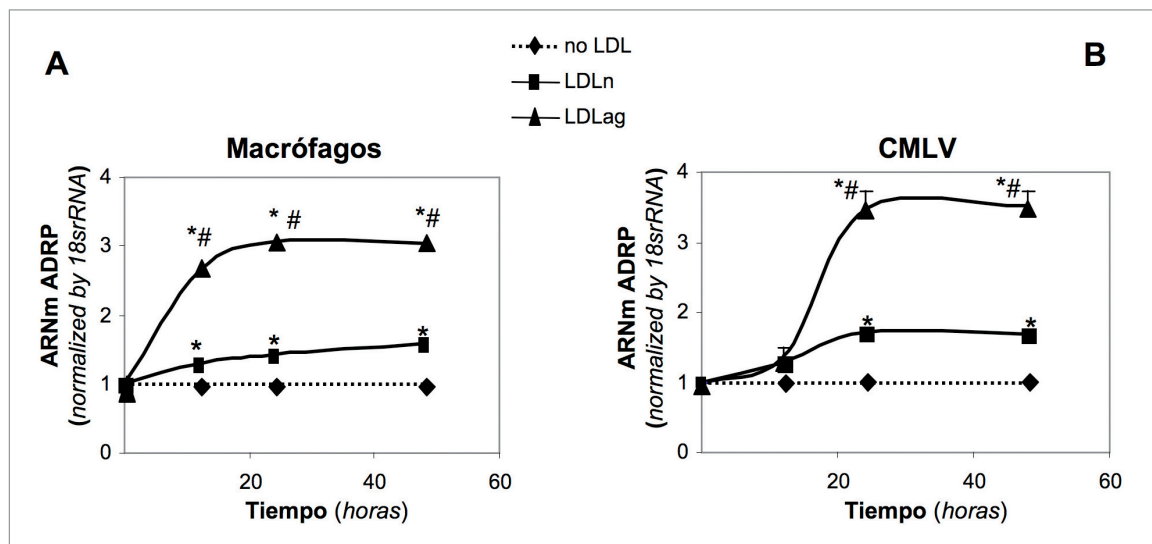


Fig. 2. Dependencia del tiempo en la expresión de ARNm de ADRP en respuesta a la exposición de las células a LDL no modificada y LDL-Lag. Los macrófagos (A) y las CMLV (B) se incubaron en ausencia (rombos), o presencia de LDL no modificada (LDLn, cuadrados) o LDL-Lag (triángulos) (100 µg/mL) durante periodos crecientes de tiempo. Las gráficas muestran la cuantificación por PCR a tiempo real de la expresión en ARNm de ADRP. Los datos se procesaron con un «software» especial basado en los Ct de cada muestra y se normalizaron por la expresión de ARNm del gen endógeno 18srRNA en los macrófagos y por la del endógeno gapdh en CMLV (n=3). *p<0.05 versus células control; # versus células expuestas a LDL no modificada.

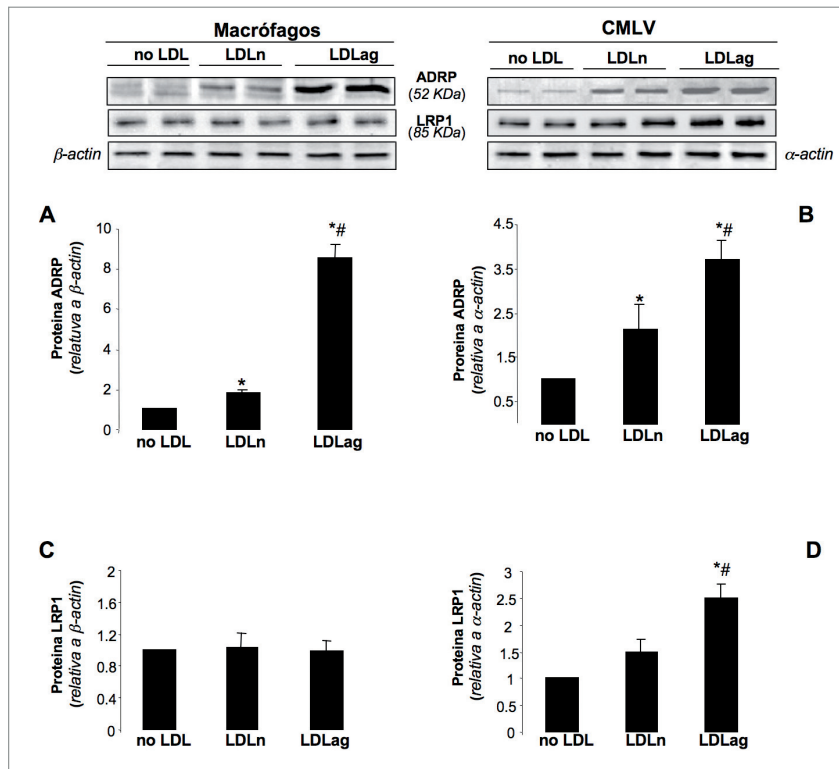


Fig. 3. Efecto de la LDL no modificada y de la LDLag en la expresión de ADRP y de LRP1. «Western blot» representativo que muestra la expresión proteica de ADRP y de LRP1 (β chain), así como de la proteína utilizada para normalizar, actina en macrófagos y CMLV incubados con LDL no modificada o LDLag (100 μ g/mL, 24 horas). Gráfico de barras que muestra la cuantificación de las bandas de ADRP en macrófagos (A) y CMLV (B), y la cuantificación de las bandas de LRP1 en macrófagos (C) y CMLV (D) incubados en ausencia o presencia de LDL no modificada o LDLag. Los resultados se expresan como el porcentaje de expresión referido a las células control (incubadas en ausencia de LDL) y se muestran como la media \pm SEM (n=3). *p<0.05 versus células control; # p<0.05 versus células expuestas a LDL no modificada.

con resultados obtenidos en nuestro grupo [14], y con la capacidad de la LDL modificada por agregación para inducir la expresión de LRP1 (Tabla 1), la LDL modificada por agregación indujo la expresión proteica de LRP1 en 2,50 veces en células musculares lisas (Figura 3). Sin embargo, la sobreexpresión de adipofilina inducida por LDL modificada por agregación en macrófagos se produjo sin un incremento paralelo de LRP1 (Figura 3).

Discusión

La agregación de las LDLs es una de las modificaciones más importantes de la LDL en la intima arterial ya que la mayor parte de la LDL se encuentra asociada a los proteoglicanos de la matriz extracelular en la intima arterial [4,5]. La LDL modificada por agregación induce una alta concentración intracelular de colesterol esterificado en dos de los tipos celulares que están estrechamente relacionados con la aterosclerosis, las CMLV y los macrófagos [6-14]. El LRP1 está involucrado en la captación de LDLag en los macrófagos [6-8] y en las CMLV [11-14]. En los macrófagos, donde la expresión basal de LRP1 es superior a la de las CMLV, el efecto de la LDLag en la expresión de ADRP requiere menos tiempo. El nivel de expresión basal de LRP1 en macró-

fagos es superior porque se ha descrito que hay una inducción de la expresión de LRP1 durante la diferenciación de monocito a macrófago [22] y, además, el M-CSF utilizado en los experimentos in vitro para la diferenciación de monocito a macrófago también se ha descrito que favorece la sobreexpresión de LRP1 [23].

En macrófagos e interesantemente también en CMLV humanas, la overexpresión de ADRP inducida por LDLag fue muy superior a la inducida por la LDL nativa, sugiriendo una importante relación entre la overexpresión de ADRP y la acumulación intracelular de colesterol esterificado en estos dos tipos celulares. La elevada capacidad de la LDLag para inducir la expresión de ADRP también la tienen otros tipos de LDL modificada tales como la LDL oxidada [24] o la LDL modificada enzimáticamente [25] que también inducen una alta concentración intracelular de colesterol esterificado en los macrófagos. Por lo tanto, LDLag, LDL oxidada y LDL modificada enzimáticamente, las cuales se interiorizan por diferentes mecanismos, ejercen un efecto común sobre la expresión de ADRP. En consecuencia, la expresión de ADRP en los macrófagos parece estar más relacionada con la capacidad de las lipoproteínas modificadas de interiorizar lípido a las células que con el mecanismo in-

volucrado en la captación de la LDL modificada. En contraste con la alta capacidad de diferentes lipoproteínas modificadas para inducir acumulación lipídica en macrófagos, la agregación de la LDL es la única modificación de la LDL capaz de inducir la acumulación de colesterol en las CMLV [26]. La captación de LDLag por las CMLV es por tanto el principal mecanismo para la formación de célula espumosa a partir de CMLV. La LDLag induce en paralelo la sobreexpresión de ADRP y la de LRP1 en CMLV [14]. Sin embargo, la LDLag no alteró significativamente la expresión del receptor *scavenger* CD36 ni en macrófagos ni en CMLV. De hecho, el CD36 parece estar positivamente regulado por LDL oxidadas mediante vías de señalización mediadas por proteína quinasa [27]. La inducción de LRP1 y ADRP por las LDLag puede conducir a la acumulación progresiva de colesterol esterificado en CMLV. Las LDLag también indujeron significativamente la expresión de ABCA1, una proteína que media la generación de HDL, en CMLV y macrófagos. Nuestros resultados están de acuerdo con previos resultados que demuestran la modulación positiva de la transcripción de ABCA1 por el colesterol intracelular [28]. La regulación a la alza de ABCA1 por colesterol se produce mediante una regulación a la baja de los niveles de SREBP-2 [29]. En nuestro grupo hemos demostrado previamente que la LDLag reduce la forma activa de SREBP-2 tanto en macrófagos [30] como en CMLV [14]. Por consiguiente, la LDLag podría regular a la alza la expresión de ABCA1 mediante la regulación a la baja de SREBP-2.

Aunque se sabe que existe una gran abundancia de ARNm de ADRP en las áreas ricas en macrófagos de las lesiones ateroscleróticas [27], se desconoce el papel de la sobreexpresión de ADRP en la formación de células espumosas a partir de CMLV. Los estudios inmunohistoquímicos de este trabajo demuestran una importante colocalización entre ADRP y macrófagos también entre ADRP y CMLV en las placas ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido.

En resumen, la LDLag induce la sobreexpresión del ARNm y la proteína de ADRP en CMLV y macrófagos. Dado que la proteína ADRP está altamente expresada en macrófagos y CMLV de las placas ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido, la captación de LDLag mediada por LRP1 juega probablemente un papel primordial en la formación de células espumosas que tiene lugar durante la progresión de las lesiones ateroscleróticas.

Agradecimientos

Este estudio se ha realizado gracias a los fondos del FIS PI051717, PN-SAF2006-10091, CB06/03, REDINCOR 06/003 y FUNDACIÓN MAPFRE.

Los autores agradecen la colaboración del equipo de Transplantes de Corazón de la División de Cardiología y Cirugía Cardíaca del Hospital de la Santa Creu I Sant Pau y también la del Banco de Sangre del Hospital de la Vall de Hebron. Los autores agradecen la ayuda técnica de Laura Nasarre. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (part I). *N Engl J Med* 1992; 326:242-50.
2. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and acute coronary syndromes (part II). *N Engl J Med* 1992; 326:310-8.
3. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew T, Khoo J, Witztum J. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-24.
4. Camejo G, Fager G, Rosengren B, Hurt-Camejo E, Bondjers G. Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993; 268:14131-7.
5. Olsson U, Camejo G, Hurt-Camejo E, Elfsber K, Wiklund O, Bondjers G. Possible functional interactions of apolipoprotein B-100 segments that associate with cell proteoglycans and the apoB/E receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:149-55.
6. Khoo JC, Miller E, Mc Loufhlín P, Steinberg D. Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis* 1988; 8:348-58.
7. Zhang WY, Gaynor PM, Kruth HS. Aggregated low density lipoprotein induces and enters surface-connected compartments on human monocyte-macrophages. *J Biol Chem* 1997; 272:31700-6.
8. Buton X, Mamdouh Z, Ghosh R, Du H, Kuriakose G, Beatini N et al. Unique cellular events occurring during the initial interaction of macrophages with matrix-retained or methylated aggregated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1999; 274:32112-21.
9. LLorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L. Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:738-46.
10. LLorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L. Differential cholesteryl ester accumulation in two human vascular smooth muscle cell subpopulations exposed to aggrega-



- ted LDL: effect of PDGF-stimulation and HMG-CoA reductase inhibition. *Atherosclerosis* 1999; 144:335-42.
11. Llorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1572-9.
 12. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Hurt-Camejo E, Martínez-González J, Badimon L. Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:387-93.
 13. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Badimon L. Differential role of heparan sulfate proteoglycans on aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells and mouse embryonic fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1905-11.
 14. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Sánchez S, Rodríguez C, Badimon L. Low density lipoprotein upregulates low density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2002; 106:3104-10.
 15. Llorente-Cortés V, Badimon L. LRP1 and the vascular wall. Implications for atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:497-504.
 16. de Roos B, Duivenvoorden I, Rucklidge G, Reid M, Ross K, Lamers RJ, et al. Response of apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice to dietary fatty acids: combining liver proteomics with physiological data. *FASEB J*. 2005 (en prensa).
 17. Exil VJ, Roberts RL, Sims H, McLaughlin JE, Malkin RA, Gardner CD et al. Very-long-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency in mice. *Circ Res* 2003; 93:448-55.
 18. Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz H-R, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and disease. *Cell Tissue Res* 1998; 294:309-21.
 19. Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 1997; 38:2249-63.
 20. Larigauderie G, Furman C, Jaye M, Lasselin C, Copin C, Fruchart J-C, et al. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: Potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:504-10.
 21. Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows. Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; 421:277-90.
 22. Hussaini IM, Sri Kumar K, Quesenberry PJ, Gonia SL. Colony stimulating factor-1 modulates a-macroglobulin receptor expression in murine bone marrow macrophages. *J Biol Chem* 1990; 265:19441-6.
 23. Watanabe Y, Inaba T, Shimano H, Gotoda T, Yamamoto K, Mokuno H et al. Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1000-6.
 24. Imamura M, Inoguchi T, Ikuyama S, Taniguchi S, Kobayashi K, Nakashima N et al. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283:E775-E783.
 25. Buechler C, Ritter M, Duong CQ, Orso E, Kapinsky M, Schmitz G. Adipophilin is a sensitive marker for lipid loading in human blood monocytes. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1532:97-104.
 26. Tertov VV, Orekhov AN, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Yaroslovov AA, et al. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation. *Circ Res* 1992; 71:218-28.
 27. Forcheron F, Legedz L, Chinetti G, Feugier P, Letexier D, Bricca G, et al. Genes of cholesterol metabolism in human atheroma: overexpression of perilipin and genes promoting cholesterol storage and repression of ABCA1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1711-7.
 28. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA, et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:12097-102.
 29. Zeng L, Liao H, Liu Y, Lee TS, Zhu M, Wang X, et al. Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism. *J Biol Chem* 2004; 279:48801-7.
 30. Llorente-Cortés V, Royo T, Otero-Viñas M, Berrozpe M, Badimon L. Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages. *Cardiovasc Res* 2007; 74:526-36.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.

ORIGINAL

Marcadores analíticos de enfermedad vascular del injerto en el trasplante cardiaco

Laboratory test markers of graft vascular disease in heart transplant patients

Gómez Moreno S, Lage Gallé E, Jiménez Díaz J, Caro Pérez A, Sánchez González A, Martínez Martínez A

Servicio de cardiología. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla

Resumen

La enfermedad vascular del injerto (EVI) afecta a más del 40% de los pacientes trasplantados cardiacos a los 5 años de seguimiento y es la primera causa de muerte después del primer año postraplante cardiaco. El objetivo es demostrar la relación entre las concentraciones de adiponectina y otras citocinas con el desarrollo de EVI y sus distintos grados de severidad.

Material y metodología: incluimos 21 pacientes a los que se realiza coronariografía-IVUS (ecografía intracoronaria) para el diagnóstico de EVI y determinamos las cifras de adiponectina. Tenían EVI por coronariografía 10 pacientes y por IVUS 14 pacientes.

Resultados: No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de adiponectina en función de la existencia de EVI diagnosticada por coronariografía ni en función del grado de severidad de la EVI por IVUS. Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la existencia de EVI diagnosticada por IVUS y las concentraciones de IL-6 ($p=0,025$) con mayores concentraciones de IL6 en los que no tenían EVI o era de grado leve y entre la existencia de EVI por coronariografía y los niveles de BNP ($p=0,014$) con niveles más elevados de BNP en los que tenían EVI. Se encontró una relación entre el sexo y los niveles de adiponectina ($p=0,025$) con niveles superiores en las mujeres. Había una relación estadísticamente significativa entre la aparición de eventos cardiacos mayores (MACE) y la existencia de EVI diagnosticada por coronariografía ($p=0,012$).

Palabras clave:

Enfermedad vascular del injerto, adiponectina.

Abstract

Graft vascular disease (GVD) affects over 40% of all heart transplant patients after 5 years of follow-up, and is the first cause of death after the first post-transplantation year. A study is made of the relationship between the concentrations of adiponectin and other cytokines and the development of GVD and its different degrees of severity.

Material and methods: The study included 21 patients subjected to coronariography-intravascular ultrasound (IVUS) for the diagnosis of GVD, with the determination of adiponectin levels. GVD was identified by coronariography in 10 patients and by IVUS in 14 patients.

Results: There were no statistically significant differences in adiponectin levels according to the existence of GVD diagnosed by coronariography, or according to the severity of GVD as determined by IVUS. Statistically significant correlations were recorded between the presence of GVD diagnosed by IVUS and the concentrations of IL-6 ($p=0.025$), with higher IL-6 levels in those without GVD or with only mild GVD; and between the presence of GVD determined by coronariography and the levels of BNP ($p=0.014$) – higher levels of this protein being found in the patients with GVD. A relationship was observed between patient gender and adiponectin levels ($p=0.025$), with higher concentrations in women. A statistically significant relationship was seen between the appearance of major adverse cardiac events (MACEs) and the existence of GVD as diagnosed by coronariography ($p=0.012$).

Key words:

Graft vascular disease, adiponectin.

Correspondencia

S. Gómez Moreno
Luis Montoto, nº 16, escalera 1,1ªA. 41003 Sevilla
silviagomezmoreno@gmail.com

Introducción

La enfermedad vascular del injerto (EVI), conocida como rechazo crónico, es la principal causa de fallo del injerto y muerte en pacientes que sobreviven más de un año al trasplante cardiaco (TC).

Desde el punto de vista morfológico, la EVI típica es una forma de aterosclerosis acelerada del injerto que se caracteriza por engrosamiento difuso y concéntrico de la íntima de las arterias epicárdicas e intramurales. En la fase tardía, genera estenosis de arterias epicárdicas y oclusión de ramas intramurales.

A los 5 años del trasplante, el 42% de los pacientes presentan algún dato de EVI angiográfica [1].

La expresión clínica puede incluir angina o infarto agudo de miocardio, sin embargo, la denervación del injerto hace que la enfermedad curse habitualmente silente hasta su fase terminal y frecuentemente el debut de la enfermedad es como arritmias ventriculares, insuficiencia cardiaca o muerte súbita. La insuficiencia cardiaca puede producirse por disfunción sistólica del injerto pero también por mecanismo diastólico. Algunos pacientes fallecen de forma súbita y se atribuye a arritmias ventriculares o trastornos graves de la conducción.

Su presencia tiene gran importancia pronóstica y se han descrito incidencias de muerte o retrasplante a 1 y 3 años del 36 y 80%, respectivamente [2]. Sin embargo, diversas medidas de prevención y tratamiento parecen haber mejorado el pronóstico y se estima que en la última década la supervivencia media tras el diagnóstico ha pasado de 2 a 4,2 años [3].

Aunque el mecanismo exacto de su patogénesis no se conoce, es creciente la evidencia que la EVI es una manifestación de una respuesta inmune crónica al corazón trasplantado sobre la que inciden factores no inmunológicos. En el presente trabajo nos hemos planteado determinar las diferencias en los niveles de adiponectina basales entre los pa-

cientes trasplantados cardiacos con EVI demostrada mediante coronariografía e IVUS y los que no han desarrollado EVI, así como la relación entre los niveles de adiponectina y la gravedad de la EVI. Además de evaluar la relación entre las concentraciones de adiponectina, el EVI y las citocinas inflamatorias (TNF, IL6, IL1) y PCR y, por último, la relación de las concentraciones de adiponectina seriadas y del desarrollo de EVI con la aparición de eventos coronarios.

Pacientes y metodología

Se estudiaron pacientes trasplantados cardiacos consecutivos que fueron sometidos a la realización de coronariografía-IVUS según el protocolo de estudio de la Unidad de Trasplante Cardiaco del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. Todos los pacientes fueron informados sobre las características y finalidad del estudio y firmaron el consentimiento informado. Este estudio cumple las normas éticas recomendadas por la VII declaración de Helsinki de la asociación Médica Mundial (2002) y por el convenio de Oviedo (1997-2000).

En la visita inicial, se realizó la historia clínica protocolizada. Se registraron las variables demográficas, de factores de riesgo coronario, historia de rechazos agudos y de infección por citomegalovirus (CMV). Se efectuó una extracción sanguínea para determinar los marcadores inflamatorios. El paciente fue sometido a la coronariografía-IVUS que estaba programada según protocolo. Posteriormente se realizaron visitas semestrales de seguimiento con una valoración clínica y de la incidencia de eventos coronarios.

La clasificación de la existencia de EVI y de su grado de severidad por coronariografía siguió la clasificación de Costanzo et al (Tabla 1) y por IVUS seguimos la clasificación de Stanford (Tabla 2).

Analizamos las variables sexo, edad, índice de masa corporal, tabaquismo, hipertensión, diabetes mellitus (tipo 1 y 2),

Tabla 1. Categorización de la enfermedad vascular del injerto según angiografía

Clase	Tronco coronario izquierdo	Varios primarios	Ramas
Leve	≤50%	Lesión máxima ≤ 70%	Estenosis aislada de una rama > 70% o cualquier estenosis de rama < 70% (incluyendo estrechamiento difuso)
Moderada	50-70%	Un vaso	Estenosis aislada de ramas > 70% en ramas de 2 sistemas
Severa	> 70%	2 ó más vasos > 70%	Estenosis aisladas de ramas > 70% en los 3 sistemas

Tabla 2. Clasificación de Stanford de la severidad de la Enfermedad Vascolar del Injerto según ecografía intravascular coronaria. Valantine et al [4].

Clase	Grado	Engrosamiento intimal (mm)	Circunferencia del vaso
0		Ninguno	Ninguno
I	Mínima	< 0,3	< 180°
II	Leve	< 0,3	> 180°
III	Moderada	0,3-0,5	> 180°
IV	Severa	> 0,5	> 180°

cifras de triglicéridos, LDL colesterol, HDL colesterol, glucemia, aclaramiento de creatinina, tiempo desde el trasplante cardiaco, rechazo agudo y su gravedad, enfermedad vascular periférica, etiología de la cardiopatía por la que se indicó el TC, edad del donante, HTA en el donante, sexo del donante, infección por CMV, presencia de EVI y su gravedad.

El seguimiento se efectuó a los 6, 12, 18 y 24 meses y evaluamos una serie de marcadores analíticos. Pro-BNP, cuyo rango de medida se encuentra entre 5-35.000 µg/ml. La adiponectina, marcador bioquímico de disfunción endotelial. La extracción se realizó en ayunas, por la mañana. Después del centrifugado, la muestra se almacenó a una temperatura entre -70°C y -130°C. La determinación de adiponectina (µg/ml) se realizó en suero por EIA mediante técnica comercial (R&D Int). También analizamos PCR, TNF, IL-6 e IL-1 como marcadores de inflamación. La determinación de PCR ultrasensible (µg/L) se midió en suero mediante técnica comercial (DADE Behring Inc) por inmunonefelometría. La IL-6, IL-1 y TNF-α (µg/ml), se midieron por EIA mediante técnica comercial (Biosource Int) en suero. Además se obtuvieron la actividad antioxidante total, los ácidos grasos libres y la vitamina E.

Los datos fueron codificados, introducidos y analizados en el programa SPSS 15.0 para Windows. Para la descripción de las variables se utilizó la estadística descriptiva. El ajuste a la normalidad de la muestra para las siguientes variables cuantitativas se realizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para la comparación entre variables numéricas se utilizó la prueba de Mann-Witney. Se calculó el coeficiente de correlación lineal «r de Pearson» para evaluar el grado de asociación de las diferentes variables cuantitativas.

Resultados

Entre los 21 pacientes sometidos a coronariografía para diagnóstico de EVI de los cuales a 16 se les había realizado también IVUS, el 81% de los pacientes eran varones y en el

57,1% de los casos la indicación para el trasplante fue cardiopatía isquémica.

La media de peso de los pacientes fue de 82,02 (DS = 13,79) kg, con unas cifras medias de colesterol LDL de 104,13 (DS = 45,3) mg/dl, cifras medias de HDL colesterol de 44,88 (DS = 8,9) mg/dl, TG basales de 142,10 (DS = 72,2) mg/dl, la cifra mediana de adiponectina fue de 6,4 mg/l (2,5-9,7), la cifra media de BNP de 337 pg/l (129-551) y el tiempo medio desde el trasplante era de 97,25 meses.

El 90,5% de los pacientes estaban en tratamiento con micofenolato, el 47,6% con tacrólimus y el 42,9% con sirolimus como agentes inmunosupresores.

El tiempo medio desde el TC hasta el diagnóstico del grupo 3 fue de 96 meses (48-144) y del grupo 4 de 104 (65-142), del grupo 1, de 91 (57-25) meses y del grupo 2, de 104 meses (71-137).

Se agruparon los pacientes con EVI por IVUS en 2 grupos; grupo 1, cuando no padecieron EVI o fue de grado leve (8 pacientes), y un segundo grupo, cuando la EVI era de grado moderado-severo (8 pacientes). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,5$) en los niveles de adiponectina entre ambos grupos. Asimismo, se clasificaron los pacientes diagnosticados de EVI en función de la coronariografía en otros dos grupos; grupo 3, los que no tenían EVI (11 pacientes) frente al grupo 4, que tenían EVI de cualquier grado (10 pacientes). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con las concentraciones de adiponectina.

Los valores de adiponectina fueron significativamente inferiores en varones ($p=0,025$). El valor mínimo en los varones fue 0,08 mg/l mientras que en las mujeres el menor valor fue 8,18 mg/l.

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la existencia de EVI diagnosticada por IVUS y las concentraciones de IL-6 ($p=0,025$), con mayores concentraciones en los que no tenían EVI o era de grado leve (7,25 µg/ml frente a 3,20 µg/ml) y también entre la existencia de EVI por coronariografía y los niveles de BNP ($p=0,014$) siendo más elevadas las concentraciones en pacientes que padecían EVI (7,5 frente a 3).

También encontramos una relación estadísticamente significativa entre la aparición de eventos cardiacos mayores (MACE) y la existencia de EVI diagnosticada por coronariografía ($p=0,012$). Todos los pacientes que sufrieron MACE (5 pacientes) tenían EVI diagnosticada por coronariografía mientras que de los 16 pacientes que no tuvieron MACE, sólo al 31,3% de los pacientes se les diagnosticó EVI por coronariografía (Tabla 3).

Tabla 3. Relación entre la aparición de eventos cardiacos mayores (MACE) y la existencia de EVI diagnosticada por coronariografía

			Grado EVI Coronariografía		
			No	Si	Total
Eventos Cardiacos adversos mayores basal	No	Recuento	11	5	16
		% del total	52,4%	23,8%	76,2%
	Si	Recuento	0	5	5
		% del total	,0%	23,8%	23,8%
Total	Recuento	11	10	21	
	% del total	52,4%	47,6%	100,0%	

$p=0,012$ (test exacto de Fisher)

Discusión

Una de las limitaciones del estudio es que las concentraciones de adiponectina se han mostrado más bajas en los pacientes con síndrome coronario agudo (IAM o angina inestable frente a la angina estable), lo que podría haber limitado el hallazgo de diferencias estadísticamente significativas en nuestro estudio que se ha desarrollado sobre pacientes en los que no se exigía como criterio de inclusión el haber sufrido un evento coronario agudo. Sin embargo, en el estudio de Pischon [7] se siguió durante 6 años a 18.225 varones libres de enfermedad cardiovascular y se encontraron que las concentraciones más elevadas de adiponectina se asociaban con un menor riesgo de IAM a largo plazo en varones. En ellos por tanto la determinación de adiponectina se realizó en situación basal, fuera del contexto de un síndrome coronario agudo.

El tiempo medio desde el TC hasta el diagnóstico del grupo 3 fue de 96,38 meses (48,87-143,88) y del grupo 4 de 103,88 (65,42-142,33), del grupo 1 de 91,45 (57,39-125,52) y del grupo 2 de 104,33 meses (71,65-137,02). Por tanto estos resultados están en consonancia con la conocida relación entre el aumento de la incidencia y severidad de EVI con el mayor tiempo transcurrido desde el TC.

Los niveles de adiponectina circulantes según estudios previos oscilan entre 2 y 3 mg/l, que son concentraciones inferiores a las obtenidas en nuestra serie de pacientes trasplantados cardiacos, mediana de 6,4 mg/l (2,5-9,7). El paciente con la cifra inferior de adiponectina tenía 80 µg/ml (0,08 mg/l) que tenía EVI severa. Los 2 pacientes con las concentraciones superiores de adiponectina (19,5 y 17,2 mg/l) tenían EVI leve y ausencia de EVI por coronariografía [4].

En nuestro estudio los niveles de adiponectina son inferiores en hombres que en mujeres con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,025$) lo que concuerda con lo

publicado en la literatura y con el hecho conocido del mayor riesgo cardiovascular de los varones comparados con las mujeres al mismo rango de edad [5-8].

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la existencia de EVI diagnosticada por IVUS o coronariografía y los niveles de adiponectina que podría también estar motivado por el pequeño tamaño muestral y por la ausencia de grupo control que pudiera hacer más evidentes las diferencias.

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la existencia de EVI diagnosticada por IVU y las concentraciones de IL-6 ($p=0,025$) y entre la existencia de EVI por coronariografía y los niveles de BNP ($p=0,014$). El BNP es un marcador muy sensible de la disfunción ventricular izquierda, incluso en pacientes asintomáticos. Tiene implicaciones diagnósticas y pronósticas en la insuficiencia cardiaca y podría también servir de marcador analítico de la existencia de EVI. Había una relación estadísticamente significativa entre la aparición de MACE y la existencia de EVI diagnosticada por coronariografía ($p=0,012$) con el test exacto de Fisher. Todos los pacientes que sufrieron MACE (5 pacientes) tenían EVI diagnosticada por coronariografía mientras que de los 16 pacientes que no tuvieron MACE, sólo el 31,3% de los pacientes tenían EVI diagnosticada por coronariografía. Esto explica que la EVI sea la primera causa de muerte después del primer año postra-plante cardiaco.

Pese a no haber encontrado en este estudio asociación estadísticamente significativa entre los valores de adiponectina y la existencia o gravedad de la EVI, ello puede deberse al escaso número de pacientes incluidos en el estudio. Ningún trabajo ha aplicado esa relación demostrada entre concentraciones de adiponectina y aterosclerosis a la EVI en pacientes trasplantados cardiacos y dada la alta prevalencia de esta entidad en estos pacientes, el mal pronóstico que



implica y la existencia de medidas terapéuticas, el identificar a estos pacientes sin necesidad de pruebas invasivas y de alto coste económico sería de gran utilidad para dirigir la necesidad de realizar estas pruebas cruentas a pacientes seleccionados y no de forma indiscriminada dada la falta de indicadores de esta enfermedad en la actualidad. El disponer de un marcador analítico como la adiponectina u otros de esta entidad sería de gran importancia porque cambiaría radicalmente el manejo y el pronóstico, por lo que el poder obtener esta información con una simple determinación de laboratorio ahorraría costes, demoras en el diagnóstico etiológico y eliminaría los riesgos que pueden derivarse del empleo de otro tipo de técnicas que se emplean con este fin, como coronariografía-IVUS. **I**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Costanzo MR, Naftel DC, Pritzker MR, Heilman JK 3rd, Boehmer JP, Brozena SC et al. Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multi-institutional study of pre-operative donor and recipient risk actors. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17:744-53.
2. Keogh AM, Valantine HA, Hunt SA, Schroeder JS, McIntosh N, Oyer PE et al. Impact of proximal or midvessel discrete coronary artery stenosis on survival after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11:892-901.
3. Cantin B, Gao SZ, Kwok BWK, et al: Prognosis of patients with significant angiographically diagnosed cardiac allograft coronary disease. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(abstr):96.
4. Valantine H, Pinto F, St-Goar G, Alderman E, Popp R. Intracoronary ultrasound imaging in heart transplant recipients: The Stanford Experience. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11:S60-S64.
5. Pischon T, Girman C, Hotamisligil G, Rifai N, Hu FB, Rimm EB et al. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004; 291:1730-7.
6. Maahs D, Orden L, Kinney G, Wadwa P, Snell-Bergeon JK, Dabelea D et al. Low plasma adiponectin levels predict progression of coronary artery calcification. *Circulation* 2005; 111:747-53.
7. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* 2003; 107:671-4.
9. Maruyoshi H, Kojima S, Funahashi T, Miyamoto S, Hokamaki J, Soejima H et al. Adiponectin is inversely related to plasminogen activator inhibitor type I in patients with stable exertional angina. *Thromb Haemost* 2004; 91:1026-30.
10. Miyazaki T, Shimada K, Moruno H, Daida H. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin is associated with smoking status in patients with coronary artery disease. *Heart* 2003; 89:663-4.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.

ORIGINAL

Reincorporación laboral del trabajador coronario: criterios objetivos para un cambio de puesto de trabajo

Coronary workers returning to work: objective criteria for a change in occupational post

Jiménez Sánchez M², Mata Escriche C², Bascuas Hernández J¹, Abad Domingo E², García Felipe A I³, Rubio Calvo E³

¹ Dpto. de Prevención de General Motors España SL; ² FREMAP; ³ Cátedra de Bioestadística. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza.

Resumen

Objetivo: protocolizar la atención a los cardiopatas para conocer la idoneidad al puesto de trabajo.

Material y metodología: analizamos 136 trabajadores varones con episodio coronario agudo (Grupo A) y 27 que habían padecido más de un episodio (Grupo B). Aplicamos el «Protocolo de actuación de reincorporación laboral del trabajador infartado» (PTI) para estudiar la idoneidad al puesto de trabajo.

Resultados: Grupo A, se reincorporaron a su trabajo anterior el 59,5% de los casos tras una media de 189 días de Incapacidad Temporal (IT). Permanecieron en IT 9,5% y pasaron a Incapacidad Permanente (IP) el 17,6%. No volvieron por defunción o por otras causas el 3,7%. En el Grupo B recayeron 18 trabajadores. El 29,6% se incorporo a su puesto anterior, el 7,4% lo hizo a un puesto de trabajo distinto. Fallecieron el 7,4% y pasaron a IP el 40,7%. Permanecieron en IT el 14,8% de los casos.

Conclusión: La mayoría de decisiones sobre incapacidad laboral que se toman en cardiología dependen de la calificación funcional del individuo en el momento de reincorporarse al trabajo.

Palabras clave:

Reubicación laboral, enfermedad coronaria.

Abstract

Objective: to standardise the healthcare of patients with heart disease to know the adaptation to the job.

Material and method: we analysed 136 male workers suffering from an acute coronary event (Group A) and a further 27 suffering from more than one event (Group B). We applied the «Protocol of action for a myocardial infarct worker returning to work» (IWW) to study the aptitude to work.

Results: Group A - 59,5% of cases returned to the usual job, with a mean of 189 days of temporal disability (TD). In TD continued 9,5% and 17,6% had permanent disability (PD). They did not return due to death or other causes 3,7%. In Group B, 18 workers experienced relapses. Returned to their regular occupational activity 29.6%. 7.4% was relocated Of those not returning, 7,4% died, 40,7% entered a permanent disability status, and 14,8% of cases had a persistent temporal disability.

Conclusion: most decisions about work disability adopted in cardiology depend on the subject's functional degree at this time.

Key words:

Work relocation, coronary disease.

Correspondencia

J. Bascuas Hernández
javier.bascuas@es.gm.com

Introducción

El número de cardiopatas y concretamente los que superan un infarto de miocardio (IM) es muy elevado, a la par que la edad de los pacientes que lo sufren aumenta y, según las actuales previsiones, lo seguirá haciendo en las próximas décadas [1]. Además, nos encontramos inmersos en un sistema social que persigue, a toda costa, la mejora de la calidad de vida, por lo cual la readaptación del cardiopata sólo se considera completa cuando éste se reincorpora a sus quehaceres habituales, aunque la calidad de vida puede ser independiente de su vuelta al trabajo [2]. La gravedad del IM constituye un factor esencial en las posibilidades de reincorporación laboral [3,4], si bien, en el caso de los pacientes cardíacos, además de estar condicionada por su patología de base y sus complicaciones, lo está, por condicionamientos psicológicos y sociales (Tabla 1) y depende de las características físicas y psicológicas del paciente [5,6]. También influye la situación económica y social de cada país, de forma que los porcentajes de pacientes en las mismas condiciones patológicas que vuelven al trabajo tras un episodio de IM varían geográficamente. Mientras en Australia y en EEUU se alcanzan tasas anuales del 87%, en Inglaterra la reincorporación laboral a los 6 meses es del 41% [7] y en España no se alcanza este porcentaje [8].

El objetivo de nuestro estudio es protocolizar la atención de los cardiopatas para conocer la carga física y psíquica asociada al puesto de trabajo en el que el trabajador va a tener que desempeñarse, analizando de manera simultánea al trabajador y al puesto de trabajo, para valorar la idoneidad entre ambos.

Material y método

Se analizaron 136 trabajadores varones que sufrieron un episodio coronario agudo (Grupo A) y otros 27 que habían padecido más de un episodio de estas características (Grupo B), entre 1988 y 2006. Todos ellos eran trabajadores pertenecientes a la plantilla de General Motors España.

Con objeto de determinar la idoneidad entre una determinada actividad laboral y las características específicas del trabajador que ha sufrido un episodio coronario agudo, aplicamos el «Protocolo de Actuación ante la Reincorporación Laboral del Trabajador Infartado» (PTI) que se basa en el análisis individualizado de los dos aspectos que interaccionan en una actividad física realizada por una persona: la carga física asociada a la actividad laboral y la repercusión fisiológica de la misma en el trabajador que la lleva a cabo.

1. Análisis de la carga física

Antes de que el trabajador ocupe su puesto de trabajo, analizamos el costo energético asociado a las tareas que debe realizar según tablas normalizadas (Normas ISO) [9], en las que viene determinado el consumo energético de tareas estándar. Estimamos el gasto energético real en el propio puesto de trabajo, mediante sistemas diseñados a tal efecto, como son GM Energy Expenditure o la ecuación de Garg, cuando se manipulen cargas, y comprobamos que el contenido calórico del trabajo, en cuanto a gasto se refiere, se encuentra por debajo de los límites prefijados.

Conociendo el valor de los METS alcanzados en la ergometría y transformados en Kc/jornada, podemos averiguar si el consumo calórico asociado al puesto de trabajo está dentro del rango de seguridad marcado. Una vez conocido que el puesto de trabajo se encuentra por debajo de este umbral, podemos realizar un estudio de la frecuencia cardíaca (FC) mediante la monitorización de la misma a través de un pulsímetro.

2. Análisis de la FC durante la actividad laboral [10]

Una vez en su puesto de trabajo monitorizamos la FC del trabajador durante la jornada laboral (incluidas las pausas) para fijar la intensidad máxima de trabajo permitido en las diferentes actividades. Posteriormente, correlacionamos la

Tabla 1. Factores que influyen en el retorno a la actividad laboral

Factores cardíacos	Factores psicológicos	Factores sociales
Severidad del infarto	Síntomas cardíacos subjetivos	Periodo de baja laboral
Angina post-infarto	Sensación de incapacidad	Edad
Insuficiencia cardíaca	Inestabilidad emocional	Clase social baja
Otras enfermedades	Pesimismo	Situación económica familiar
	Preocupación por la salud	Desempleo
	Sobreprotección familiar	Aislamiento social
		Trabajos de esfuerzo
		Consejo erróneo del médico

Tabla 2. Días de incapacidad temporal por grupos de edad según actividad laboral

Edad (años)	Casos	Manufacturas	Técnicos	Días IT Media (DS)
<45	35	33	2	211 (146)
46 – 55	81	71	10	244 (169)
56 – 65	20	17	3	231 (195)

FC con los informes ergométricos o clínicos, efectuando un análisis de la gráfica, para conocer cualitativamente la respuesta fisiológica del paciente y observar las distintas fases del trabajo y un histograma acumulado para determinar cuando se superó la FC.

Los costos cardíacos, informan sobre el número de pulsaciones por minuto en que la basal es superada por la media:

- Costo cardíaco absoluto (CCA) = FC media (FCm) - FC reposo (FCo)
- Costo cardíaco relativo (CCR) = CCA/FC máx - FCo

El metabolismo equivalente, es aquel que en una prueba de esfuerzo habría dado lugar a la misma FC media:

$$FCm = a + bMeq$$

Donde:

$$a = FCo - bMo; b = FCmáx - FCo / Mmáx - Mo$$

siendo la FCmáx = 205,5 - 0,62*edad

$$Mmax = (75 - 0,40 * edad) * peso \text{ (hombres)}$$

$$Mmax = (56 - 0,35 * edad) * peso \text{ (mujeres)}$$

(Unidades: edad en años, metabolismo en vatios, peso en Kg).

También calculamos el porcentaje del Mmax utilizado y la dosis. El porcentaje del Mmax utilizado determina la penalidad global del trabajo (una jornada de 8 horas debe estar limitada al 33% del MMax; el 100% del Mmax sólo puede ser mantenido durante 5 minutos).

La relación entre el tiempo de trabajo real y su tiempo límite, considerando el porcentaje del Mmax utilizado, es la denominada dosis. La dosis límite sería 100.

$$\text{Dosis} = (\text{tiempo de trabajo} / d1) * 100, \text{ donde:}$$

$$d1 = 5700 / 10 \cdot 0,031 * p$$

Además comprobaremos si la FC rebasa la recomendada como FCE (Frecuencia Cardíaca de Entrenamiento).

$$FCE = FC \text{ basal} + 60\% \text{ (FC máxima alcanzada en la ergometría - FC basal)}$$

$$FCE = FC \text{ basal} + 60\% \text{ (FC intolerancia - FC basal)}$$

Para mantener la actividad laboral durante 8 horas al día, ésta debe consumir un 40% de la capacidad funcional calculada en la ergometría.

En el caso de que no se indicaran los METS alcanzados en la ergometría, podríamos calcularlos con la fórmula:

$$\text{METS trabajo} = (0,60 + \text{METS máx. alcanzados en ergometría} / 100) \times \text{METS máx.}$$

Si el resultado de la monitorización rebasaba alguno de los criterios prefijados procedimos a limitar la actividad o a reubicar el trabajador en otro puesto.

Diseñamos tablas de contingencia, utilizándose el estadístico Chi-cuadrado a fin de establecer la asociación o independencia entre dos variables de este tipo. Mediante el Test de Kolmogorov-Smirnov comprobamos la distribución normal de las variables y con el estadístico de Levene verificamos la homocedasticidad de las varianzas. Cuando el tamaño de alguna de las muestras era muy pequeño se utilizó la U de Mann-Whitney o el Kuskal-Wallis. La correlación entre dos variables fue medida con el coeficiente de Pearson o la p de Sperman. En todos los casos se consideró el nivel de significación de 0,05.

Resultados

En base a las características de su trabajo habitual, 15 casos del Grupo A (11%) realizaban tareas técnicas (edad media = 52 años; DS = 5 años) y el resto 121 (89%) tareas de manufacturación (edad media = 49 años; DS = 6 años). La edad media del Grupo A fue de 49 años (DS = 6 años). La edad no fue un factor determinante a la hora de sufrir un episodio coronario agudo.

Los días de incapacidad temporal (IT) asociados a los procesos fueron superiores en el grupo de trabajadores relacionados con tareas relacionadas con las manufacturas (Tabla 2), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. Tampoco encontramos correlación entre la edad y los días de IT ($r = 0,042$) ($p < 0,05$) (Tabla 3).

Se reincorporaron al trabajo que desempeñaban con anterioridad a sufrir el episodio cardíaco el 59,5% de los casos, con una media de 189 días de IT. Permanecieron en IT 13 casos (9,5%) y pasaron a incapacidad permanente (IP) el 17,6%. Sin volver a la actividad laboral, por defunción o por otras causas, 5 pacientes (3,7%).

De los trabajadores que se incorporaron a la vida laboral, 81 lo hicieron a su puesto habitual (14 técnicos y 67 de manufacturas) y en 13 casos se decidió previamente recomendar un cambio de puesto de trabajo, indefinido en 11 casos (8,1%) y temporal en 2 (1,5%). Al analizar la relación entre días de IT y puesto de trabajo ocupado tras el episodio

Tabla 3. Evolución de los casos según tipo de actividad tras la reincorporación laboral

Resolución	%	casos	Manufacturas	Técnicos	Días IT
Incorporados	59,5	81	67	14	189,7
CPT indefinido	8,1	11	11	-	213,7
CT temporal	1,5	2	2	-	178,5
Siguen en IT	9,5	13	13	-	-
IP	17,6	24	23	1	423,7
Fallecidos	2,2	3	3	-	95
Otras causas	1,5	2	2	-	422

(CPT: cambio de puesto de trabajo; CT: centro transicional. IT: incapacidad temporal; IP: incapacidad permanente).

Tabla 4. Duración total de la IT por grupos de edad en trabajadores que han sufrido más de 1 episodio coronario

Edad (años)	casos	Duración IT recaídas Días (DS)
36 - 45	7	221 (91)
46 - 55	21	243 (179)
56 - 65	5	289 (133)

coronario, no vimos diferencias en los que se incorporaron a su puesto de trabajo habitual como en los que se decidió recomendar un cambio de puesto de trabajo ($p > 0,05$).

Por el contrario, no se encontró significativa la asociación entre edad y el paso a incapacidad permanente ($p < 0,05$) siendo la de los casos que se vieron abocados a una situación de IP de 52 años (DS = 5 años); mientras que en los que no la obtuvieron era 49 años (DS = 6 años).

En el grupo B se encuadraron los 27 trabajadores que sufrieron más de un episodio coronario agudo. De éstos, 4 desempeñaban su trabajo en áreas técnicas y 23 en áreas de manufacturas. No encontramos una asociación entre el tipo de actividad laboral y la aparición de una o más de una recaída de un episodio coronario agudo. De este grupo de

pacientes presentaron recaída 18 trabajadores de los cuales, 7 pacientes sufrieron 2 episodios, dos presentaron 3 y otros dos trabajadores 4 episodios coronarios.

Al comparar la variable edad según actividad laboral no se encontró asociación significativa ($p > 0,05$). Tampoco las vimos al analizar la duración de la IT por grupos de edad ($p > 0,05$) (Tabla 4).

En cuanto a la evolución de estos casos, el 29,6% se incorporaron a su actividad laboral habitual. El 7,4% lo hicieron en un puesto de trabajo distinto al que venían ocupando con anterioridad al episodio coronario. De los que no se incorporaron fallecieron el 7,4%, pasaron a situación de incapacidad permanente el 40,7% y permanecieron en incapacidad temporal el 14,8% de los casos (Tabla 5).

Discusión

La readaptación del cardiópata sólo se considera completa cuando se reincorpora a sus quehaceres habituales incluidos los laborales. Igualmente, la gravedad del IM unida a la persistencia de angina, la capacidad funcional restante y, en definitiva, con la estratificación del riesgo cardiovascular, constituyen factores esenciales en las posibilidades de reincorporación laboral tras el mismo [3,4]. Tampoco podemos olvidar otros factores que pueden condicionar la prolonga-

Tabla 5. Actividad tras la reincorporación laboral de trabajadores con más de 1 episodio coronario

Resolución	%	Nº casos	Manufacturas	Técnicos
Incorpora trabajo habitual	29,6%	8	6	2
CPT indefinido	3,7%	1	1	-
CT	3,7%	1	1	-
Siguen en IT	14,8%	4	3	1
IP	40,7%	11	9	2
Fallecidos	7,4%	2	2	-

(CPT: cambio de puesto de trabajo; CT: centro transicional. IT: incapacidad temporal; IP: incapacidad permanente).



ción del periodo de incapacidad como son una edad elevada, pertenecer a una clase social baja, una situación desahogada familiar y la carga física que, para el paciente infartado, se asocia a su puesto de trabajo, siendo frecuente que el paciente atribuya el IM al trabajo [11-13].

En el caso de los pacientes que han sufrido un infarto de miocardio nos apoyamos en la información del especialista pero cuando tenemos que trasladar dicha información a la situación real de trabajo la decisión es más difícil. Antes de volver al trabajo tendremos que tener claras las exigencias físicas del mismo, así como el ambiente en el que se desarrolla. En este tipo de pacientes no se aconseja realizar esfuerzos físicos violentos con tensión emocional ni la exposición brusca al frío.

Para determinar de manera objetiva la idoneidad entre el puesto de trabajo y la situación clínica en pacientes infartados, se ha propuesto comparar el costo energético del puesto de trabajo, con el resultado obtenido por el paciente en la prueba de esfuerzo, ya que esa información es suficiente para orientar al paciente sobre sus posibilidades de reinserción laboral, recreativa o en programas de actividad física, limitando el riesgo a un accidente inesperado [14-17].

Según Januzzi et al. [18], el periodo de baja está directamente relacionado con la incapacidad permanente, aunque para otros [4-6][12,19] una de las causas que mayor número de incapacidades laborales produce es el consejo erróneo del médico que conduce al aislamiento social, inseguridad y ansiedad ante la reinserción laboral, generando un sentimiento de sobreprotección por parte de la familia imposibilitando la vuelta a su puesto laboral.

En base, a la prueba de esfuerzo podríamos aconsejar la vuelta al trabajo según los gastos energéticos teóricos de cada profesión, teniendo en cuenta que para las actividades que supongan esfuerzos físicos importantes de forma continuada, es preciso establecer un margen de seguridad, desaconsejándose actividades cuyos requerimientos energéticos superen el 40% del gasto energético alcanzado en la ergometría [20,21].

La estimación del consumo energético del puesto de trabajo puede realizarse con tablas que relacionan el consumo metabólico y el tipo de actividad, o con pruebas instrumentales como la monitorización de la frecuencia cardiaca. De esta manera, se evalúa el grado de carga física asociado al puesto de trabajo y que de ser inapropiada podría constituir una barrera infranqueable para el trabajador.

No hay que olvidar que la anamnesis permite tener una idea de la capacidad funcional restante del trabajador y, por tanto, de la calidad de vida del mismo. Para ello podemos tener como referencia diferentes escalas comparativas de es-

fuerzo. Sin embargo, dado que el objetivo fundamental es la mejora de la calidad de vida, es preciso analizar, además de las variables relacionadas a la carga física asociada al puesto de trabajo, otras que contemplan aspectos relativos al bienestar psicológico y social. Para nosotros esto no es condición suficiente para considerar a la persona apta para un determinado trabajo de tal manera que exigimos otros requisitos como no encontrarse aislado y evitar la conducción de vehículos dentro de la factoría, la manipulación de cargas y los esfuerzos con los brazos elevados [22] que con frecuencia, después de IM de cara inferior, producen arritmias. También hay que evitar trabajos con movimientos repetidos [23].

El protocolo presentado cumple con los aspectos recomendados en la literatura [13-15][24,25], facilitando la toma de decisiones, por parte del médico del trabajo, sobre la idoneidad entre una determinada actividad laboral y el trabajador que la ocupa tras haber sufrido un episodio coronario agudo. Sin embargo, conviene considerar que la mayoría de decisiones sobre incapacidad laboral que se toman en cardiología dependen, en gran medida, del grado funcional que el individuo tiene en ese momento. La capacidad funcional es un indicador de salud que hay que evaluar adecuadamente en el paciente cardíaco. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Velasco JA. Objetivos de la rehabilitación cardiaca. Estudio actual y perspectivas de futuro. En: JA de Velasco, JJ Moreira (eds). Rehabilitación del paciente cardíaco. Barcelona: Doyma; 1993:1-9.
2. De Velasco JA. Aspectos sociales de la rehabilitación, readaptación social y profesional. Mejora de la calidad de vida. En: JA de Velasco, JJ Moreira (eds). Rehabilitación del paciente cardíaco. Barcelona: Doyma; 1993:61-70.
3. Weinblatt E, Shapiro S, Frank CW, Sager RV. Return to work and work status following first myocardial infarction. *Am J Publ Health* 1966; 56:169-85.
4. Davidson DM. Return to work after cardiac events: a review. *J Card Rehabil* 1983; 3:60-90.
5. Wiklund I. Readjustment after a first myocardial infarction with special reference to emotional reaction and coping. Goteborg, Kompendier-Lindome, 1984:1-50.
6. Velasco JA, Tormo V. Reincorporación al trabajo después de un infarto de miocardio. *Med Clin (Barc)* 1977; 530:1-53.
7. Goble AJ, Worcester MU. Best practice guidelines for cardiac rehabilitation and secondary prevention. Melbourne: the Heart Research Centre, Victoria; 1999. URL: <http://www.dhs.vic.gov.au/phd/9905015/contents.htm>.



8. Alegría Ezquerro E, Grau Sepúlveda A, Prujá Arteaga E, Alins Rami I. Actuación ante el paciente que ha sufrido un infarto de miocardio. En: Tratamiento de la Cardiopatía Isquémica por el médico general. Madrid. Ed. Ergón; 1995
9. ISO 8996:1990 (E). Ergonomics. Determination of metabolic heat production.
10. Galíndez Alberdi I. La monitorización de la frecuencia cardíaca en el puesto de trabajo. Revista Castellana de Medicina y Seguridad del Trabajo 1992; 27:12-4.
11. Cay EL, Vetter N, Philip A, Dugard P. Return to work after myocardial infarction. Lancet 1971; II:454-6.
12. Groog SH, Levine SH. The heart patients recovers: social and psychological factors. Nueva York, Human Sciences Press, 1977.
13. Wiklund I, Sanne H, Vedin A, Wilhelmsson C. Role and attitude towards disease and working life two months after a myocardial infarction. Scand J Rehab Med 1984; 16:57-64.
14. De Velasco JA, Maureira JJ. Rehabilitación a lo largo plazo. Asociación o grupos de cardíacos rehabilitados. En: JA de Velasco, JJ Maureira (eds). Rehabilitación del paciente cardíaco. Barcelona: Doyma; 1993:107-12.
15. Gavilanes Vázquez M. La ergometría en medicina del trabajo. Revista Castellana de Medicina y Seguridad del Trabajo 1992; 266:24-9.
16. Jolliffe JA, Ress K, Taylor RS, Thompson D, Oldridge N, Ebrahim S. Exercise-based rehabilitation for coronary heart disease. The Cochrane Library, Issue 4, Oxford, 2002.
17. Physical activity an cardiovascular health. National Institute of Health. Consensus Development Panel on Physical Activity and Cardiovascular health. JAMA 1996; 2786:241-6.
18. Januzzi JL, Stern TA, Pasternak RC, De Sanctus RW. The influence of anxiety and depresión on outcomes of patients with coronary artery disease. Arch Intern Med 2000; 160:1913-21.
19. Gutiérrez Morlote J, Vacas Arlandis M, Lobato García A, Llorca Diaz J, Prieto Solis JA, Doménech Delgado J, et al. Impacto del infarto de miocardio en la situación laboral de los pacientes. Rev Esp Cardiol 1999; 52:556-562.
20. Rodríguez FA. Prescripción de ejercicio para la salud (I). Resistencia cardiorrespiratoria. Educación Física y Deporte 1995:87-102.
21. Artigao R. Rehabilitación cardíaca: efectos sobre el pronóstico. En: Maroto JM, De Pablo C, Artigao R, Morales MD, (eds). Rehabilitación cardíaca. Madrid, Ed Olalla 1999:509-20.
22. Maureira JJ. La terapia ocupacional en la rehabilitación cardíaca. En: JA de Velasco, JJ Maureira (eds). Rehabilitación del paciente cardíaco. Barcelona: Doyma; 1993:71-9.
23. Maroto JM, de Pablo C. Aspectos especiales de la rehabilitación después de la revascularización coronaria. En: JA de Velasco, JJ Maureira (eds). Rehabilitación del paciente cardíaco. Barcelona: Doyma; 1993:125-37.
24. Serra Grima JR. Retorno al trabajo después de un infarto de miocardio. Editorial. Jano 1990; 927:16-22.
25. Fletcher GF. How to implement physical activity in primary and secondary prevention. A Statement for healthcare professionals from the task force on risk reduction. Am Heart Ass Circulation 1997; 97:335-57.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.

ORIGINAL

Incontinencia urinaria de esfuerzo y ejercicios del suelo pélvico. Estudio comparativo entre la eficacia de un entrenamiento individualizado vs instrucciones básicas

Stress urinary incontinence and pelvic floor muscle exercises: effectiveness two different training intensive versus home instructions

Tejero M¹, Marco E¹, Boza R¹, Selva F¹, Piqueras M¹, Guillén A¹, Castillo M T², Muniesa J M^{a 1}

¹ Hospital de la Esperanza. IMAS.IMIM Barcelona. ² Hospital del Mar. IMAS. IMIM: Barcelona

Resumen

Objetivos: Comparar dos programas de entrenamiento de la musculatura del suelo pélvico (ESP) en mujeres diagnosticadas de Incontinencia Urinaria de Esfuerzo (IUE).

Material y Metodos: estudio clínico prospectivo aleatorizado. Variables clínicas y obstétricas relacionadas con la IUE, Escala analógica visual (EVA) de disconfort, IIQ, perineometría y test de hisopo. Las 56 pacientes fueron agrupadas en, Grupo A: realizaron 12 sesiones de entrenamiento ESP con *biofeed-back* y Grupo B: realizaron una sesión individualizada donde se explica como deben realizarse los ESP. A ambos se les indicó que deben realizar los ejercicios en casa varias veces al día. Revisión a los 4 meses tras el tratamiento.

Resultados: ambos grupos eran similares, excepto en el grado de severidad de IUE. Encontramos relación entre EVA y IIQ Emocional ($p=0.02$). Todas las pacientes presentaron mejoría del EVA, a los 4 meses ($p=0.036$); el grupo A mejoró más que el B ($p=0.028$). Todas las pacientes presentan mejoría en IIQ total al final del tratamiento ($p=0,01$), y en los resultados de la perineometría ($p=0,007$).

Conclusiones: Tras el tratamiento de rehabilitación en ambos grupos encontramos una mejoría en EVA perineometría y el IIQ pero sin diferencias entre ambos grupos.

Palabras clave:

Incontinencia urinaria de esfuerzo, perineometría, ejercicios suelo pélvico.

Abstract

Objectives: 1) To compare the results of two different pelvic floor training (PFT) protocols. 2) To study the relationship between the Incontinence Impact Questionnaire (IIQ) and the discomfort perception of patients.

Methods: Prospective study of 56 SUI women. Main variables registered: age, stage of SUI, Visual Analogue Score (VAS) of discomfort before and after training, IIQ score before and after training (physical activity and emotional situation subscales); Perineometry; Isopo Test. Women were randomly assigned to Group A (who underwent 12 individual sessions consisting to PFT and biofeedback system) or Group B (consisting of 1 individual session of PFT). Patients were instructed to do exercises at home and were assessed at 4 months after treatment.

Results: Mean age 54.7 (DE 11.3) A statistically significant difference was found between VAS and emotional IIQ ($p=0.02$). The AS of discomfort was significantly reduced in all women ($p=0,025$). All women showed improvement in IIQ score ($p=0.01$) and perineometry- máx. voluntary contraction ($p=0,007$) and no differences were observed between groups.

Conclusions: The patients of both protocols presented improvement in the VAS, perineometry and the IIQ. A statistical significant relation was observed between VAS and emotional IIQ score.

Key Words:

Stress urinary incontinence, women, perineometry, quality of life, pelvic floor exercise.

Correspondencia

M. Tejero Sánchez
Servicio de Medicina Física y Rehabilitación
Hospital de l'Esperança. IMAS. Barcelona
mtejero@imas.imim.es

I Introducción

La incontinencia urinaria de esfuerzo (IUE) es una patología muy frecuente en la mujer adulta aunque difícil de establecer con exactitud. A pesar de que en estudios epidemiológicos se haya encontrado una prevalencia de incontinencia urinaria en la mujer del 40%, el porcentaje que corresponde a IUE específica es difícil de calcular, ya que en estos tipos de análisis se valoran los síntomas y no se realizan pruebas urodinámicas diagnósticas [1]. Además, la distribución de los distintos tipos clínicos de incontinencia urinaria varía según las series y es dependiente de la edad.

Las series más amplias consideran que el porcentaje de incontinencia con la tos oscila alrededor del 40% del total de incontinencia urinaria, la incontinencia asociada a urgencia miccional se sitúa alrededor del 7% y a la incontinencia con síntomas de ambos tipos (ó mixta) le corresponde el 53% restante [2]. Con esta información y teniendo en cuenta los datos de algunos estudios de validación clínico-urodinámica, podríamos establecer que, aproximadamente, un 12% de las mujeres padecen IUE aislada [3].

Actualmente algunos autores consideran que el tratamiento quirúrgico es el más efectivo en la resolución de la IUE [4], sin embargo la aparición de efectos secundarios postoperatorios ha favorecido la utilización de tratamientos menos agresivos, como la rehabilitación perineal o del suelo pélvico [5,6] siendo el conjunto de técnicas utilizadas en dicha rehabilitación útiles en el manejo de la IUE; así Virseda y colaboradores [1] refieren en un metaanálisis realizado sobre la eficacia de la rehabilitación en el tratamiento de la IUE que la rehabilitación perineal presenta una Odds Ratio favorable respecto al placebo o a la abstención terapéutica de 7,03 (intervalo confianza 4,99 – 9,89) [1]; en la revisión efectuada por Hay-Smith y colaboradores para la Cochrane Library se concluye que la rehabilitación de la musculatura del suelo pélvico parece ser un tratamiento efectivo en la IUE y en la incontinencia mixta [7] respecto al placebo o a la abstención terapéutica.

Una vez establecida científicamente la eficacia del entrenamiento de la musculatura del suelo pélvico para el tratamiento de la IUE, quedan algunos aspectos por aclarar siendo uno de ellos el de si la intensidad de tratamiento se relaciona con los resultados obtenidos a corto, medio y largo plazo [7]; ya que existen autores que, en sus trabajos, relatan beneficios en la incontinencia femenina tan sólo con instrucciones de ejercicios impartidas en el ámbito de atención primaria [8,9,10]; pero estos beneficios ¿son similares a los obtenidos tras la realización de un programa individualizado de entrenamiento?; ¿el cumplimiento es similar

entre un grupo que sólo recibe instrucciones respecto al que hace un entrenamiento dirigido?; ¿es comparable el grado de satisfacción respecto los resultados obtenidos de ambos grupos?, etc.

Partiendo de la hipótesis de que una mayor intensidad terapéutica inicial produce un mayor cumplimiento del tratamiento y por lo tanto una mejor respuesta clínica, planteamos el objetivo principal del presente trabajo: constatar que un programa de instrucciones para la realización de ejercicios de suelo pélvico es significativamente de menor eficacia que un entrenamiento realizado de forma individualizada en un Servicio de Rehabilitación.

I Material y método

Se realizó un estudio clínico prospectivo aleatorizado, con la inclusión de 62 pacientes femeninas remitidas al servicio de rehabilitación, con edad superior o igual a 18 años, diagnosticadas de Incontinencia Urinaria de Esfuerzo genuina [7] que dieran su consentimiento por escrito.

Los criterios de exclusión fueron: Pacientes que no cumplieran los criterios de inclusión; presencia de alteraciones neurológicas y/o alteraciones cognitivas que pudieran alterar la capacidad de colaborar en el tratamiento; presencia de enuresis nocturna; embarazadas o bien mujeres postparto reciente (6 meses); y mujeres con prolapso uro-genital que sobrepasase el introito vaginal.

Las pacientes reclutadas eran distribuidas de forma aleatoria en dos grupos de tratamiento:

Grupo A o Intensivo: las pacientes realizaban un entrenamiento individual de la musculatura del suelo pélvico mediante sistema de *bio-feed back* durante 12 sesiones consecutivas, cada sesión tenía una duración de 40 minutos [11].

Grupo B o Corto: las pacientes realizaban una sesión individualizada de 40 minutos, donde recibían una explicación por parte de la fisioterapeuta de las instrucciones para la realización de los ejercicios perineales y el tipo de entrenamiento a realizar en domicilio.

Las variables registradas fueron:

- Variables Clínicas: edad; índice de masa corporal (IMC); antecedentes patológicos; antecedentes obstétricos relacionados como número de partos y menopausia; grado de IUE genuina (grado I leve; grado II moderada; grado III severa); tiempo evolución en meses IUE; tratamientos previos (farmacológico o quirúrgico)
- Escala Visual Analógica (EVA) respecto al grado de molestia ocasionada por la incontinencia, rangos de 0 a 100; 0 = ninguna molestia y 100 = máxima molestia tolerada.

Tabla 1. Descripción de la muestra

	Grupo A (N=27)		Grupo B (N = 29)		
	X	DE	X	DE	
Edad (años)	55	11	55	11	NS
IMC (Kg/m ²)	28,2	5,2	27,3	3,3	NS
EVA previo (mm)	53,3	20,9	53,4	15,7	NS
N partos vaginales	1,7	1,1	2,1	1,2	NS
Evolución < 1 año	0 (0%)		2 (6,9%)		NS
Evolución 1 – 5 años	12 (44%)		16 (55,2%)		
Evolución 5 -10 años	6 (22%)		6 (20%)		
Evolución >10 años	9 (33%)		5 (17%)		
Grado I (leve)	8 (32%)		19 (65%)		p≤0,01
Grado II (moderado)	13 (52%)		9 (31%)		
Grado III (grave)	4 (16%)		1 (3,5%)		

X = media; NS: no significativo p: nivel de significación estadística = $\alpha < 0,05$. DE: desviación estándar.

- Cuestionario de calidad de vida específico, Incontinence Impact Questionnaire (IIQ) [12] se utilizó la versión reducida en la cual se evalúa la influencia de la IUE sobre 5 situaciones físicas y 2 aspectos emocionales (anexo 1) El rango del IIQ global es 0 cuando la IUE no afecta en ninguna situación y 42 cuando la IUE siempre afecta a todas las actividades [13].
 - Perineometría: sistema de registro que permite obtener la presión vaginal en estado basal, o bien cuando se realiza una maniobra de esfuerzo o Valsalva. En nuestras pacientes se registraba la presión vaginal en reposo y al realizar la máxima contracción voluntaria de la musculatura del periné, la presión se medía en mmHg. Ambos registros se realizaban al inicio del programa y a los 4 meses.
 - Test de hisopo: permite valorar la hipermovilidad uretral en valores angulares. Se coloca un hisopo estéril y lubricado en la luz uretral de la paciente, la cual permanece en decubito supino con las piernas semiflexionadas, se pide a la paciente que realice una maniobra de Valsalva observando el desplazamiento del hisopo en grados; si este es mayor de 30 grados, nos confirma la hipermovilidad uretral siendo un indicador de hiperlaxitud del suelo pélvico.
 - Grado de mejoría subjetiva tras el tratamiento: mejor, igual o peor.
 - Grado de cumplimiento del programa de ejercicios del suelo pélvico tras los 4 meses: realización de los ejercicios y con qué frecuencia.
- Las variables cualitativas se presentan con su frecuencia

absoluta y porcentaje correspondiente. Las variables cuantitativas se presentan con su media y desviación estándar.

Los contrastes para las variables cualitativas se realizaron utilizando la prueba de Ji al cuadrado, o la prueba exacta de Fisher, en función de los criterios de aplicabilidad. Cuando la variable era cuantitativa, tras analizar el supuesto de normalidad de dicha variable, se compararon los grupos utilizando la prueba «t» de Student para datos independientes y análisis de la varianza para datos apareados. Para estudiar la asociación entre variables cuantitativas se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

El nivel de significación utilizado en todos los contrastes fue $\alpha = 0,05$.

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 12.

Resultados

Desde Enero de 2004 a diciembre de 2006 se incluyeron 62 mujeres afectas de IUE. Las pacientes fueron divididas en dos grupos de tratamiento, 31 pacientes en el grupo Grupo A o tratamiento intensivo, y 31 pacientes en el grupo B o corto; de las pacientes inicialmente incluidas 4 nos informaron que abandonaban el estudio, una se retiró por embarazo y otra por intervención quirúrgica.

En la Tabla 1 se hace una descripción de la muestra. Ambos grupos eran similares excepto en la severidad de la incontinencia, observándose que en el grupo A más del 50% de las mujeres presentaban IUE grado II mientras que en el grupo B más del 50% de mujeres presentaban IUE grado I, siendo esta diferencia significativa ($p = 0,001$).

Anexo I. Incontinence impact questionnaire

Algunas mujeres presentan pérdidas de orina que ocasionan trastornos no sólo en las actividades físicas cotidianas, sino también en las relaciones personales y en los sentimientos. Las preguntas están encaminadas a determinar cómo la incontinencia ha influido o cambiado las actividades. Para cada pregunta elija la respuesta que mejor describa en qué grado las diferentes actividades se ven afectadas por la IU.

La Incontinencia Urinaria Afecta:	Nunca	A veces	Frecuente	Siempre
1. Habilidad para las actividades domésticas (cocinar, limpiar...).				
2. Actividades físicas como caminar, nadar, etc.	0	1	2	3
3. Actividades lúdicas tales como ir al cine, conciertos, etc.	0	1	2	3
4. Habilidad para trasladarse en autobús o en coche por periodos superiores a los 20 min.	0	1	2	3
5. Participación en actividades sociales fuera de casa.	0	1	2	3
6. Salud emocional.	0	1	2	3
7. Dicho problema hace que en ocasiones experimente sensación de:				
<input type="checkbox"/> Nerviosismo				
<input type="checkbox"/> Miedo				
<input type="checkbox"/> Frustración				
<input type="checkbox"/> Cólera				
<input type="checkbox"/> Depresión				
<input type="checkbox"/> Desconcierto				

Sólo 3 pacientes de ambos grupos realizaban tratamiento farmacológico específico para el tratamiento de IUE.

Respecto a los resultados del cuestionario IIQ se analizaron los valores globales y se diferenció entre los valores obtenidos del ítem referidos a la actividad física y/o lúdica (IIQ funcional: rango de 0-30); los valores obtenidos en ítem relacionados con el estado emocional (IIQ emocional: rango 0-12). En todas las variables no se detectaron diferencias entre ambos grupos.

En la Tabla 2 se hace una descripción de las variables de Perineometría y test del Hisopo. Observamos que el grupo A presenta valores de presión basal significativamente más altos que el grupo B.

Realizamos un estudio de correlación entre la EVA y el test IIQ global, IIQ funcional y IIQ emocional. Detectamos

una correlación positiva entre la EVA con IIQ total ($p=0.03$) y IIQ emocional ($p=0.03$).

Control a los 4 meses:

Del total de las pacientes incluidas en el estudio 16 (59%) pacientes del grupo A acudieron al control del tratamiento, y 20 (68%) pacientes del Grupo B acudieron al control.

Los resultados sobre la cumplimentación del tratamiento y satisfacción se describen en la Tabla 3.

Para poder analizar los resultados de la EVA, perineometría y Tests del Hisopo tras el tratamiento fue necesario ajustar los resultados en relación con el grado de severidad de IUE de ambos grupos, ya que en el grupo A las pacientes básicamente estaban significativamente peor que en el grupo B.

Una vez ajustado el EVA en función del grado de IUE, en

Tabla 2. Descripción de las variables de perineometría e hisopo

	Grupo A		Grupo B		
	X	DE	X	DE	
Perinometría basal (mmHg)	23,75	12,2	15,8	10,8	$p=0,037$
Perinometría máxima (mmHg)	45,8	14,2	35	22,2	NS
Hisopos (°)	21,6		20,2		NS

X = media; DE= desviación estandar; NS = no significativo.

Tabla 3. Control de cumplimiento y mejoría subjetiva tras el tratamiento

	Grupo A	Grupo B	
Realiza los ejercicios:			
Sí	16 (100%)	16 (88%)	NS
No	0 (0%)	2 (11,1%)	NS
Frecuencia:			
diaria	9 (64,3%)	10 (55,6%)	NS
>4/semana	3 (21,4%)	2 (11,1%)	NS
<3/semana	2 (14,3%)	4 (22,2%)	NS
nunca	0 (0%)	2 (11,1%)	NS
Ha mejorado	10 (71,4%)	12 (66,7%)	NS
Está igual	4 (28,6%)	6 (33,3%)	NS

NS: no significativo.

el grupo A las pacientes presentaban una mejoría significativa ($p=0.036$), en el grupo B no se observaban cambios, y al comparar el EVA en función de los tratamientos, el intensivo fue estadísticamente mejor que el corto con $p=0,028$. (Figura 1).

Respecto la perineometría únicamente se observó una mejoría significativa en la presión máxima ($p=0.007$) en ambos grupos, al comparar ambas terapias no hubo diferencias. (Figura 2).

En el test del Hisopo no se observaron cambios significativos. De igual manera hallamos una mejoría en los resultados del IIQ global ($p=0.01$) e IIQ emocional ($p=0.005$) de las pacientes, sin que hubiera diferencias entre ambos tratamientos.

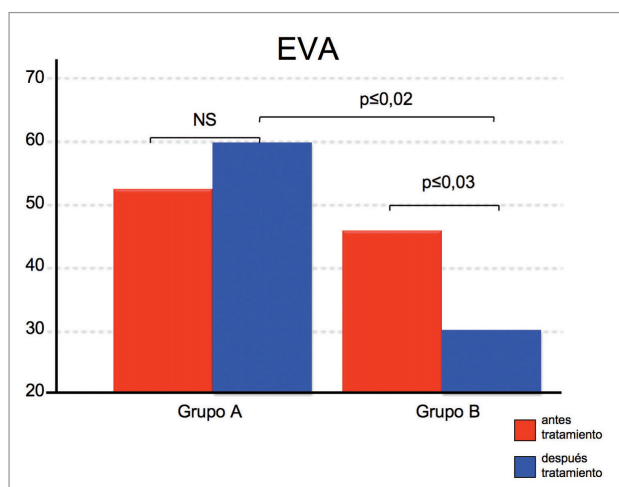


Fig. 1. Resultados del EVA tras el tratamiento en ambos grupos.

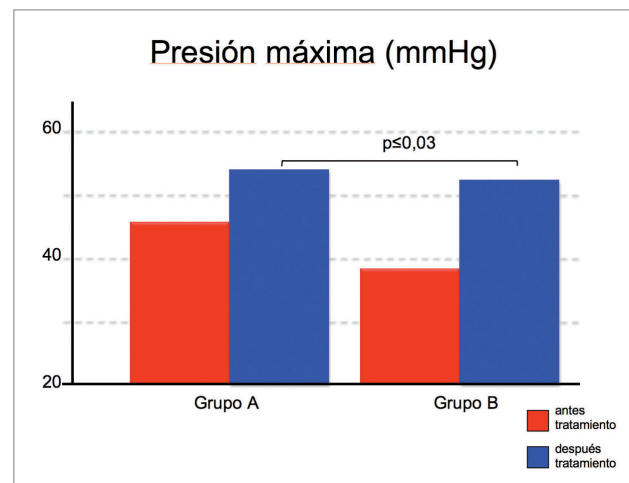


Fig. 2. Resultados de la presión máxima valorada por perineometría tras el tratamiento.

Discusión

Este estudio analiza los cambios en los valores objetivos y subjetivos en pacientes que realizan un tratamiento rehabilitador para la IUE, e intenta demostrar si existen diferencias entre las dos terapias.

Los hallazgos confirman que el tratamiento rehabilitador es efectivo pero rechaza la hipótesis de que un tratamiento de mayor intensidad permita obtener mejores resultados objetivos, a pesar de que sí existen diferencias en cuanto a la valoración subjetiva del tratamiento entre ambos grupos de terapia.

El entrenamiento de la musculatura del suelo pélvico está recomendado por la WHO/ICI. Un meta-análisis demuestra que un entrenamiento continuado ofrece una mejoría 23

veces mayor que el grupo de control [14], pero las múltiples publicaciones aún no han determinado que terapia es la más indicada.

Una revisión publicada en la revista *Chocrane* concluye que un tratamiento intensivo presenta mejores resultados que un tratamiento estándar, sobretodo a largo plazo [7], en nuestro caso se han valorado los resultados a los 4 meses de la intervención, por lo que no sabemos que sucede con nuestras pacientes a largo plazo. Aun así, a los 4 meses, casi el 100% de pacientes que acuden al control realizan los ejercicios, la mayoría los realiza cada día y aproximadamente un 70% encuentran una mejoría clínica subjetiva, independientemente al tratamiento realizado.

Al igual que el ensayo clínico publicado por Parkkinen et al [15], nuestros resultados evidencian que no existen diferencias significativas entre un tratamiento intensivo y uno corto, y que todas las pacientes presentan mejoría clínica subjetiva y objetiva. Por otro lado un tratamiento intensivo puede mejorar la adherencia del tratamiento a largo plazo [16,17].

Antes de continuar hay que recordar que sí había una diferencia entre grupos, en el grupo A las pacientes estaban clínicamente peor que en el grupo B, y era el grupo A el que realizaba la terapia más intensiva. Una vez obtenido los resultados finales, estos fueron analizados teniendo en cuenta esta diferencia entre grupos. Esto nos debería hacer pensar que la intensidad de la terapia ha de estar en relación con la severidad de la incontinencia, pacientes con grados leves de IUE serían tributarias a un tratamiento de menor intensidad y pacientes con grados más severos deberían realizar terapias más intensas. La heterogeneidad estadística reflejada en las múltiples publicaciones sobre el entrenamiento de la musculatura del suelo pélvico nos hace pensar que los resultados están relacionados con la edad de la paciente, el tipo de incontinencia, con el programa de tratamiento, etc, [18].

Respecto la perineometría nuestra muestra presenta un aumento significativo de la presión máxima tras el tratamiento. Gunnarsson et al [19] demostraron una correlación entre una mejoría en las medidas de presión intravaginales y una mejoría clínica subjetiva. Aksac et al [20] también observaron un aumento de la presión intravaginal medida por perineometría tras un programa de ejercicios en un grupo de pacientes y una mejoría clínica significativa. Por lo que podríamos concluir que la perineometría es una prueba útil en la valoración clínica y en la evolución en un programa de rehabilitación.

La calidad de vida es un parámetro a tener en cuenta; en un estudio se observa que los resultados clínicos van acom-

pañados con una mejoría en los resultados de IIQ [21] tras un programa de rehabilitación. En nuestro estudio hay una mejoría significativa en el IIQ tras el tratamiento, independientemente al tratamiento realizado. Dinizi et al [22] observaron que un grupo de mujeres que realizan un tratamiento supervisado presentan una mejoría significativa en IIQ respecto al grupo control, por lo que podríamos concluir que un tratamiento activo, a pesar de ser corto en el tiempo, mejora la calidad de vida de nuestras pacientes con incontinencia urinaria.

Un programa de ejercicios supervisado, cualquiera que sea su intensidad, ofrece una mejoría clínica objetiva y mejora la calidad de vida de nuestras pacientes afectas de incontinencia urinaria de esfuerzo, evaluadas a los 4 meses de su aplicación. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Virseda M, Salinas J, Martín C. Metaanálisis de la eficacia de la rehabilitación perineal para el tratamiento de la incontinencia urinaria de esfuerzo femenina. *Arch Esp Urol* 2002; 55:937-42.
2. Temml C, Haidinger G, Schmidbauer J, Schatzl G, Madersbacher S. Urinary incontinence in both sexes: Prevalence rates and impact on quality of life and sexual life. *Neurol Urodyn* 2000; 19: 259-71.
3. Teba F, Virseda M, Salinas J. Incontinencia urinaria femenina: correlación clínico-urodinámica. *Arch Esp Urol* 1999; 52:237-41.
4. Hutchings A, Griffiths J. Surgery for stress incontinence: factors associated with a successful outcome. *Br J Urol* 1998; 82:634-41.
5. Brubaker L, Kotarinos R. Kegel or cut? *J Reprod Med* 1993; 38:672-8.
6. Nygaard IE, Kreder KJ, Lopic MM, Fountain KA, Rhomberg AT. Efficacy of pelvic floor muscle exercises in women with stress, urge, and mixed urinary incontinence. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174:120-5.
7. Hay-Smith EJC, Bo K, Berghmans LCM, Hendriks HJM, de Bie RA, van Waalwijk van Doorn ESC. Pelvic floor muscle training for urinary incontinence in women. *The Cochrane Library* 2003.
8. Lagro-Janssen TL, Debruyne FM, Smits AJ, van Weel C. Controlled trial of pelvic floor exercises in the treatment of urinary stress incontinence in general practice. *Br J Gen Pract* 1991; 41:445-9.
9. Moore KN, Saltmarche B, Query A. Urinary incontinence. Non-surgical management by family physicians. *Can Fam Physician* 2003; 49:602-10.



10. Lagro-Janssen TL, Debruyne FM, Smits AJ, van Weel C. The effects of treatment of urinary incontinence in general practice. *Fam Prac* 1992; 9:284-9.
11. Goode PS, Burgio KL, Locher JL, Roth DL, Umlauf MG, Richter HE, et al. Effect of Behavioral Training with or without Pelvic Floor Electrical Stimulation on Stress Incontinence in Women. *JAMA* 2003; 290:345-52.
12. Shumaker SA, Wyman JF, Uebersax JS, McClish DK, Fantl JA. Health-related quality of life measures for women with urinary incontinence-the Incontinence Impact Questionnaire and the Urogenital Distress Inventory. *Qual Life Res* 1994; 3:291-306.
13. Espuna M, Rebollo P, Puig M. Validation of the Spanish version of international Consultation on Incontinence Questionnaire-Short Form. A questionnaire for assessing the urinary incontinence. *Med Clin (Barc)* 2004; 122:288-92.
14. Northon P, Brubaker L. Urinary incontinence in women. *Lancet* 2006; 367:57-67.
15. Parkkinen A, Karjalainen E, Vartiainen M, Penttinen J. Physiotherapy for female stress urinary incontinence: individual therapy an the outpatient clinic versis home-based pelvic floor training;a 5-year follow-up study. *Neurourol Urodyn* 2004; 23:643-8.
16. Cjiarelli P, Murphy B, Cockburn J. Promoting urinary continence in post-partum women: 12 month follow-up data from a randomised controlled trial. *Int Uroginecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2004;15:99-105.
17. Alewijnse D, Metsemakers JF, Mesters IE, van den Borne B. Effectiveness of pelvic floor muscle exercise therapy supplemented with a health education program to promote long-term adherence among women with urinary incontinence. *Neurourol Urodyn* 2003; 22:284-95.
18. Hay.Smith EJC, Dumoulin C. Pelvic floor muscle training versus no treatment, or inactive control treatment, for urinary incontinence in women. *Chocrane Database Sys Rev* 2007 Issue 1.
19. Gunnarsson M, Teleman P, Mattiasson A, Lidfeldt J, Nerbrand C, Samsioe G. Effects of pelvic floor exercises in middle age women with a history naïve urinary incontinence: a population based study. *Eur Urol* 2002; 41:556-61.
20. Aksac B, Aki S, Karan A, Yalcin O, Isikoglu M, Eskiyurt N. Biofeedback and pelvic floor exercises for the rehabilitation of urinary stress incontinence. *Gynecol Obstet Invest* 2003; 56:23-7.
21. Lamers BH, Van der Vaart CH. Medium.term efficacy of pelvic floor muscle training for female urinary incontinence in daily practice. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2007; 18:301-7.
22. Zanetti MR, Castro R de A, Rotta AL, Santos PD, Sartori M, Girao MJ. Impact of supervised physiotherapi pelvic floor exercise for treaning female stress urinary incontinence. *Sao Paulo Med J* 2007; 125:265-9.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.

ORIGINAL

Cambios en la actividad cerebral en el envejecimiento normal en una tarea con interferencia valorados mediante magnetoencefalografía

Magnetoencephalographic assessment of changes in brain activity in normal aging when performing a task under interference conditions

Solesio E, Maestú F, Campo P, Capilla A, Mangas B, González J, Ortiz T

Centro de Magnetoencefalografía Dr. Pérez Modrego (Universidad Complutense de Madrid)

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: determinar si la realización de una tarea de reconocimiento con interferencia activa, producía cambios en los patrones de activación cerebral con respecto a la presentación de otra con interferencia pasiva.

Población y metodología: en veinte ancianos sanos se midió con magnetoencefalografía. Se realizó a cada uno de ellos la escala de Memoria de Wechsler-III (WMS-III), la escala de Inteligencia de Wechsler, el Boston Naming Test, el test de fluidez verbal, el test de clasificación de tarjetas de Wisconsin, el trail Making Test y el test de colores y palabras (STROOP). Los registros se llevaron a cabo mediante un magnetoencefalógrafo de 148 canales capaz de medir la actividad magnética generada en toda la convexidad craneal.

Resultados: encontramos una mayor activación en la condición de interferencia activa en las regiones mediales temporales, corteza visual, y región ventral anterior durante los primeros 400 milisegundos en el hemisferio izquierdo y únicamente en el derecho para la corteza visual, mientras que en la condición de interferencia pasiva, se obtuvo una mayor activación en la región ventral anterior durante los 700-800 milisegundos en el hemisferio izquierdo.

Conclusión: la presentación de estos dos tipos de interferencia, activa y pasiva, modula los patrones de activación fronto-temporales en el envejecimiento normal.

Palabras clave:

Memoria operativa, disfunción ejecutiva, magnetoencefalografía, interferencia activa, interferencia pasiva.

Abstract

Objective: To determine whether performing a recognition task under interference conditions produces changes in brain activity pattern compared with the activity seen under conditions of passive interference.

Population and methods: Twenty healthy elderly subjects were subjected to magnetoencephalography. In each patient we applied the Wechsler Memory Scale-III (WMS-III), the Wechsler Intelligence Scale, the Boston Naming Test, the verbal fluency test, the Wisconsin card classification test, the Trail Making Test and the colors and words test (STROOP). The recordings were made using a 148-channel magnetoencephalograph capable of measuring the magnetic activity generated within the entire cranial convexity.

Results: Greater activation was recorded under active interference conditions in the medial temporal regions, visual cortex and anterior ventral area in the first 400 ms in the left hemisphere and only in the right hemisphere for the visual cortex, while under passive interference conditions, increased activation was obtained in the anterior ventral region during the 700-800 ms in the left hemisphere.

Conclusion: The presentation of both types of interference, active and passive, modulates the fronto-temporal activation patterns in normal aging.

Key words:

Working memory, executive dysfunction, magnetoencephalography, active interference, passive interference.

Correspondencia

E. Solesio Jofre de Villegas
Centro de Magnetoencefalografía Dr. Pérez Moreno.
Facultad de Medicina, pabellón 8.
Avda. Complutense s/n. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.

I Introducción

Los sistemas de memoria

La memoria es uno de los procesos cognitivos que mayores alteraciones sufre con la edad. Para la mayoría de los autores, se trata de un sistema complejo formado por diferentes módulos interdependientes y portadores, tanto de sustratos neurales, como de correlatos cognitivos [1]. Desde un punto de vista funcional, se lleva a cabo una interacción entre mecanismos de adquisición, mantenimiento y recuperación regidos mediante ciertas reglas de funcionamiento [2].

Podemos clasificar distintos tipos: En primer lugar, los registros sensoriales, dentro de los cuales se encuentran la memoria icónica y la ecoica [3].

La información procedente de los registros sensoriales, pasa al almacén a corto plazo, sistema encargado, tanto de la retención inmediata de la información, como del procesamiento activo de la misma. Centrándonos en este segundo aspecto, cobra especial relevancia la memoria operativa, entendida como un sistema que retiene y manipula temporalmente la información [4].

Por último tenemos la memoria a largo plazo, que se caracteriza por tener una disponibilidad ilimitada, aunque la información no esté siempre accesible.

Existen tres regiones cerebrales estrechamente relacionadas con los procesos mnésicos. La primera, es el sistema mesial del lóbulo temporal compuesto por la formación hipocámpica, la corteza del giro parahipocámpico y la corteza perirral. El segundo, las estructuras corticales, fundamentalmente, las áreas prefrontales y las regiones anteriores del lóbulo temporal. El tercero, las estructuras diencefálicas de la línea media que comprenden los núcleos mamilares y los núcleos talámicos anteriores y mediodorsales [5].

La memoria operativa es un gestor de recursos mnésicos limitados, por lo que la entrada de información nueva puede interferir sobre aquella con la que se estaba trabajando previamente, fenómeno denominado interferencia retroactiva, que puede resultar normal en población joven y anciana, pero que se acentúa en personas con disfunciones cognitivas [6].

Es uno de los factores que más contribuyen a un bajo rendimiento mnésico en el envejecimiento. La resistencia a la interferencia es un mecanismo de control que requiere la actuación de las funciones ejecutivas, término con el que nos referimos a todas aquellas actividades complejas necesarias para planificar, iniciar, inhibir y flexibilizar nuestra conducta y que involucran a la corteza prefrontal. Se sabe

que dicha corteza es una de las estructuras cerebrales que muestra mayor afección como consecuencia del envejecimiento [7], por lo que resulta lógico que los ancianos muestren más dificultades a la hora de poner en marcha tales mecanismos de control. Pese a haber discrepancias conceptuales entre estos dos términos, funciones ejecutivas y memoria de trabajo, la existencia de una relación entre ellas es universalmente reconocida [8].

Mientras que la codificación y manipulación de la información depende preferentemente de la corteza prefrontal dorsolateral, el mantenimiento se relaciona con la región dorsolateral y ventromedial [9].

Nuestro estudio se centra en el envejecimiento normal que no cursa con ninguna patología neurológica ni psiquiátrica específica, pero en el que se produce un declive de ciertas funciones cognitivas. El objetivo es esclarecer si la causa fundamental de olvido en el envejecimiento se debe a una dificultad mnésica o a una disfunción ejecutiva por falta de control sobre la interferencia.

I Material y método

Inicialmente se seleccionó una muestra de 31 sujetos sin antecedentes médico-psiquiátricos, aspecto que se valoró mediante la aplicación de una Entrevista inicial semi-estructurada, la Escala de Depresión Geriátrica de Yesavage Reducida y el Mini Examen Cognoscitivo.

Criterios de exclusión:

1. Diagnóstico psiquiátrico descrito por el DSM-IV-TR.
2. Presencia de enfermedades médicas, de tipo epilepsia, narcolepsia, diabetes o cardiopatías.
3. Obtención una puntuación superior a 5 en la GDS reducida.
4. Obtención una puntuación inferior a 28 en el MEC.
5. Presencia de fuentes de ruido exterior durante el registro de la actividad magnética con la MEG.
6. Presencia de fuentes de ruido intraindividuales durante el registro con la MEG, por ejemplo, prótesis dentales fijas.

Once de los 31 sujetos iniciales tuvieron que ser descartados por cumplir alguno de los criterios de exclusión. La muestra definitiva estuvo compuesta por 20 sujetos, 3 hombres y 17 mujeres, todos ellos pertenecientes a la Universidad para mayores de la UCM. La media de edad fue de 64.30 años (desviación típica de 4,97 años).

Evaluación Neuropsicológica

Se llevó en una sesión de una hora y media de duración. Pruebas aplicadas:

- Escala de Memoria de Wechsler-III (WMS-III):
 - Memoria Lógica I. ■ Letras y números.
 - Memoria Lógica II. ■ Cubos de Corsi.
- Escala de Inteligencia de Wechsler para Adultos, 3º Edición (WAIS-III):
 - Dígitos.
 - Clave de números.
- Boston Naming Test (BNT).
- Test de fluidez verbal (FAS).
- Test de clasificación de tarjetas de Wisconsin (WCST).
- Trail Making Test (TMT).
- Test de colores y palabras (STROOP).

La magnetoencefalografía es una técnica de neuroimagen funcional que mide la actividad magnética dendrítica post-sináptica de las neuronas piramidales que constituyen la corteza cerebral, con una resolución temporal de milisegundos y espacial de milímetros.

Los registros se llevaron a cabo mediante un magnetoencefalógrafo de 148 canales (Magnes 2500, 4-D Neuroimaging, Inc., San Diego, CA) capaz de medir la actividad magnética generada en toda la convexidad craneal. Se aplicó un filtro de paso de banda entre 0,1 y 50 Hz para eliminar posibles fuentes de ruido y la señal fue digitalizada en ventanas de 1000 ms (tasa de muestreo de 254 Hz.), incluyendo 150 ms preestímulo. Los estímulos fueron valorados de manera individual para rechazar aquellos que se encontraban artefactados. Las fuentes de actividad magnética fueron analizadas en función del Modelo «*Single equivalent current dipole*» y se ajustaron cada 4ms utilizando un algoritmo no lineal de Levenberg-Marquardt [10].

Estos datos fueron fusionados con la correspondiente resonancia magnética potenciada en T1 y adquirida en 3D.

Las variables contempladas con la MEG fueron áreas corticales y el número de dipolos por área por ventana temporal.

Condiciones y diseño experimental

Se establecieron dos grupos experimentales. Los sujetos realizaban una tarea de memoria a la vez que realizábamos el registro con MEG:

- *Condición de interferencia activa (N=10)*. Se presentaban series de 4 letras (alta carga) a memorizar. Tras un intervalo de tiempo (2-3 segundos), se le proponía al sujeto que verificase una operación aritmética simple (suma de tipo: 3+3=7), pulsando un botón si dicha operación era correcta u otro si era incorrecta. Pasados 2 segundos, debía realizar una tarea de reconocimiento: se presentaban dos letras de manera secuencial y debía decidir si cada una de ellas había sido memorizada en la fase previa o no, para ello, pulsaba de nuevo un botón u otro.

- *Condición de interferencia pasiva (N=10)*. Exactamente igual que la anterior, con la salvedad de que el participante no debía resolver ninguna operación aritmética. Para poder controlar la variable de presentación de números, se mostraba: 0+0=0, que, por supuesto, no debía valorar.

Nuestro análisis se centró, en ambas condiciones, en la actividad cerebral registrada durante la tarea de reconocimiento.

Para la realización del análisis de datos se utilizó el Paquete Estadístico SPSS. Nuestro diseño experimental es un modelo lineal $A \times B \times C$ con medidas repetidas en B y en C. La variable Inter-sujetos (A) = Interferencia. Consta de dos niveles activa y pasiva. Las variables intra-sujetos fueron hemisferio (B) con dos niveles izquierdo (1) y derecho (2). La latencia (C) fue de 10 niveles: 0-100 ms (1), 100-200 ms [2] hasta 900-1000 ms (10).

La estadística se realizó teniendo en cuenta todas las latencias en un mismo análisis de varianza. Se llevó a cabo una reagrupación de las distintas áreas anatómica y funcionalmente relacionadas y se utilizó un nivel de significación $p < ,05$. Se analizaron los efectos de cada uno de los factores por separado, las interacciones dobles y las triples con el fin de encontrar alguna diferencia significativa. En caso de que así fuera, realizamos además una prueba T.

Resultados

Se apreció una triple interacción en la condición de interferencia activa en las siguientes áreas:

Regiones mediales del lóbulo temporal ($F_{9,162} = 2,104$; $p = ,032$), concretamente en el hemisferio izquierdo, en la latencia temporal de 100 a 200 ms ($t_{18} = 2,872$; $p = ,010$); (Figura 1).

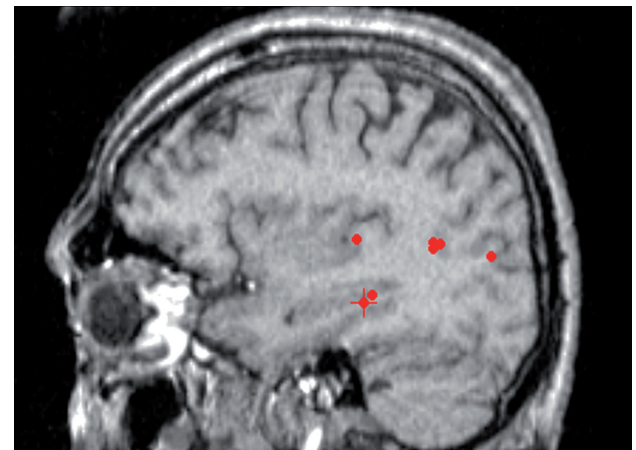


Fig. 1.

Corteza visual ($F_{9,162} = 1,889$; $p = ,057$). Se observa un incremento del número de dipolos en el hemisferio izquierdo en la ventana temporal de 100-200ms ($t_{18} = 2,358$; $p = ,003$) y en el hemisferio derecho durante los 100 primeros milisegundos ($t_{18} = 2,236$; $p = ,038$).

Región prefrontal ventral anterior ($F_{9,162} = 2,913$; $p = ,003$). Obtenemos un incremento de la actividad cerebral en el hemisferio izquierdo en la condición de interferencia activa en la latencia de 300-400ms ($t_{18} = 2,195$; $p = ,045$) (Figura 2).

Observamos una triple interacción en la condición de interferencia pasiva en las siguientes áreas:

Región prefrontal ventral anterior ($F_{9,162} = 2,913$; $p = ,003$), en el hemisferio izquierdo en la latencia de los 700 a 800 ms ($t_{18} = -2,399$, $p = ,027$) (Figura 3).

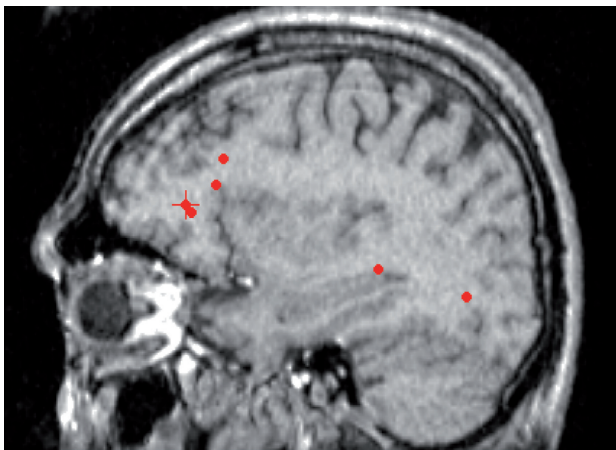


Fig. 2.

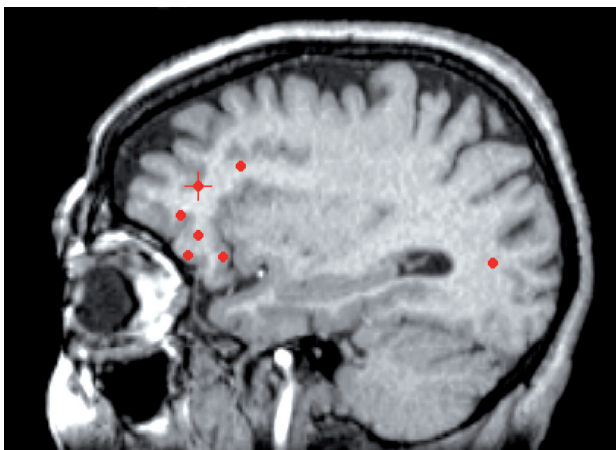


Fig. 3.

Discusión

Este estudio ha revelado importantes hallazgos de gran utilidad, tanto para comprender mejor las causas del deterioro mnésico en el anciano, como para la realización de posible plan de intervención.

Podemos afirmar que la presentación de interferencia durante la fase de mantenimiento en una tarea de reconocimiento, da lugar a cambios en el patrón de activación cerebral. Obtenemos una mayor actividad, en la condición de interferencia activa, en las regiones mediales del lóbulo temporal, corteza visual y región prefrontal ventral anterior. Únicamente encontramos un mayor número de dipolos en la condición de interferencia pasiva en esta última región en una latencia concreta.

Los efectos se producen en ventanas temporales específicas, lo que demuestra que se trata de sucesos cognitivos concretos, no de una actividad mantenida.

Las primeras regiones a resaltar son las mediales del lóbulo temporal. Se observa un incremento del número de dipolos en la condición de interferencia activa en latencias tempranas (100-200 ms) del hemisferio izquierdo. Estudios previos [8] han demostrado que, durante la fase de interferencia, se produce un incremento del flujo sanguíneo cerebral en dichas regiones, lo que evidencia que tales estructuras juegan un papel fundamental en la reorganización de esquemas y control de la estimulación entrante en el sistema cognitivo [11]. El hecho de que las diferencias se produzcan en latencias tempranas, indica que el Hipocampo cobra un papel determinante en las etapas iniciales del procesamiento de la información como sistema de recuperación de un esquema previamente memorizado [12] y dentro de una red de control de interferencia.

En la corteza visual, aparece un aumento de la actividad magnética en el hemisferio izquierdo, durante la ventana temporal de los 100 a 200 ms y en el hemisferio derecho, durante los 100 primeros milisegundos.

La región prefrontal ventral anterior muestra una mayor activación en la condición de interferencia activa en el hemisferio izquierdo durante los 300-400 ms., mientras que aparece mayor actividad magnética en la condición de interferencia pasiva en latencias tardías (700-800 ms). Dicha región se ha relacionado con la selección de información semántica a largo plazo: para categorizar el valor funcional de un nuevo estímulo, del que se realiza un proceso de mantenimiento al dar una respuesta demorada, es necesario acceder a la información a largo plazo disponible sobre dicho estímulo.

Cabría esperar una activación dorsolateral que no hemos encontrado. Esto puede deberse a que tal activación está

implicada en procesos de codificación, manipulación y mantenimiento de la información [9] y, en el presente estudio, hemos analizado el reconocimiento. Esperamos encontrar tales patrones de activación en posteriores estudios centrados en el análisis de los procesos de codificación (memorizar de entrada las cuatro letras iniciales), manipulación (realización de la operación aritmética sencilla) y mantenimiento (continuar memorizando las letras) de la información.

De todo esto podríamos concluir la presencia de una red límbico-frontal, formada por regiones mediales del lóbulo temporal y región prefrontal ventral, que modula el control de la interferencia en el envejecimiento normal. Esto se encuentra en concordancia con la pérdida progresiva de funcionalidad en regiones prefrontales y mediales del lóbulo temporal [7], responsable de una disminución en la resistencia a la interferencia y por tanto, de dificultades en el mantenimiento de la información y en la recuperación posterior.

En resumen, la baja resistencia a la interferencia podría constituir una de las fuentes de olvido más importantes en el envejecimiento normal, lo cual lleva asociadas disfunciones ejecutivas y dificultades mnésicas. Por tanto, los programas de rehabilitación y estimulación de memoria, deberían centrarse en el entrenamiento de estrategias en el control de la interferencia para conseguir un mejor funcionamiento y adaptación de los ancianos a su ambiente. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tulving E. How many memory systems are there? *Am Psychologist* 1985; 40:385-98.
2. Sherry DF, Schacter DL. The evolution of multiple memory systems. *Psychological Rev* 1987; 94:439-54.
3. Ruiz-Vargas JM. Las memorias sensoriales, en *Psicología de la memoria*. Alianza Editorial, Madrid, 1998, pp:87-114.
4. Baddeley AD, Hitch G. Working memory. En: GA Bower (ed): *The psychology of learning and motivation*, vol.8. Academic Press: New York, 1974; pp:125-37.
5. Arellano J. Neuroanatomía de la memoria. En: JM Muñoz Céspedes, A Ruano (eds). *Cerebro y memoria*. Fundación MAPFRE Medicina, Madrid 2004; pp:69-105.
6. Baddeley AD. *Human memory: theory and practice*. Hove Psychology Press, Londres, 1997.
7. Craik FIM, Grady CL. Aging, memory and frontal lobe functioning. En: RR Knight, DT Stuss (eds.). *Principles of frontal lobe function*. Oxford University Press, New York, 2002; pp:528-40.
8. Gazzaley A, Cooney JW, Rissman J, D'Esposito M. Top-down suppression deficit underlies working memory impairment in normal aging. *Nature Neurosci* 2005; 8:1791-5.
9. D'Esposito M, Postle BR. Working memory function in lateral prefrontal cortex. En: DT Stuss, RT Knight (eds). *Principles of frontal lobe function*. Oxford University Press, New York, 2002; pp:541-60.
10. Ortiz T, Fernández A, Maestú F, Amo C, Sequeira C. Fundamentos biofísicos en Magnetoencefalografía. Longares, Madrid, 2001; pp:21-7.
11. Lepage M, Habib R, Cormier H, Houle S, McIntosh AR. Neural correlates of semantic associative encoding in episodic memory. *Cogn Brain Res* 2000; 9:271-80.
12. Knight RT. Contribution of human hippocampal region to novelty detection. *Nature* 1996; 383:256-9.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.

ORIGINAL

Transdiferenciación de células mesenquimales del tejido adiposo: hacia una terapia celular para enfermedades degenerativas de la retina

Transdifferentiation of mesenchymal stem cells from adipose tissue: Through a cellular therapy for degenerative retinal diseases

Marcos S ¹, Jaén A ¹, González D ¹, Andreu S ¹, Avilés M ², Fernández E ¹

¹ Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche; ² Departamento de Oftalmología, Universidad de Murcia, Murcia, España

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivos: Obtención de células troncales mesenquimales de tejido adiposo para trasplante y recuperación funcional de retinas degeneradas.

Material y metodología: Extracción de la grasa inguinal de ratones transgénicos para proteína verde fluorescente y aislamiento de las células troncales mesenquimales. Estas células fueron implantadas utilizando inoculaciones intravítreas y subretinianas en un modelo murino (rd10) que asemeja la retinosis pigmentaria autosomal recesiva humana. Expresión de genes involucrados en el desarrollo de la retina mediante RT-PCR.

Resultados: Nuestros resultados demuestran que en ambos abordajes quirúrgicos las células trasplantadas sobreviven, migran y se integran en diferentes capas de la retina de los ratones rd10. Además hemos identificado la expresión de genes en embriones y cuerpos embrionarios (Otx2, NF200, Pax6 periferina, IRBP) que pueden ser utilizados como activadores o potenciadores de la transdiferenciación.

Conclusiones: las células mesenquimales del tejido adiposo reúnen las condiciones necesarias para su potencial uso en la terapia de enfermedades degenerativas de la retina. Los cuerpos embrionarios representan un modelo útil para estudiar los mecanismos reguladores de la diferenciación de las células retinianas.

Palabras clave:

Terapia celular, células troncales, cuerpos embrionarios, retinosis pigmentaria.

Abstract

Objectives: To obtain adult mesenchymal stem cells from adipose tissue to be used in cellular therapies aimed to retinal regeneration.

Material and Methods: isolation of adult mesenchymal stem cells from adipose tissue of green fluorescent protein transgenic mice. Recipient mouse eyes were transplanted with these cells by using intravitreal and subretinal procedures. We have used a mice model of human autosomal recessive retinitis pigmentosa (rd10). Gene expression by means of RT-PCR of mRNA isolated from embryo eyes (E9,5 to E18,5); post-natal eyes (P1 to P10) and adults eyes. That technique was also used in mouse embryoid bodies spontaneously differentiated from embryonic stem cells ES-D3.

Results: In both surgical procedures we observed survival, migration and integration of mesenchymal stem cells into several retinal layers. We have also identified the expression of some retinal genes (Otx2, NF200, Pax6, peripherin, IRBP) which may help to drive the mesenchymal stem cells transdifferentiation.

Conclusions: Mesenchymal cells are very promising to be used in degenerative retinal diseases. We emphasize the usefulness of mouse embryoid bodies as a model to study the regulatory mechanisms of retinal neurons differentiation and its potential for obtaining retinal progenitors.

Key words:

Cellular therapy, stem cells, embryoid bodies, retinitis pigmentosa.

Correspondencia

E. Fernández
Instituto de Bioingeniería.
Universidad Miguel Hernández. Avda. Universidad s/n. Elche 03202 Alicante
e.fernandez@umh.es

Introducción

Los problemas visuales representan una de las cuatro causas principales de pérdida de independencia entre las personas mayores. Además, el envejecimiento de la población en los países desarrollados, fruto del descenso de la natalidad y el incremento de la esperanza de vida, hace que estas cifras vayan aumentando progresivamente, dando lugar a alteraciones de la visión que implican una pérdida importante de la agudeza y del campo visual. En este contexto, las degeneraciones retinianas, especialmente la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE), son responsables de casi el 50% de todos los casos de baja visión.

La degeneración y muerte de los fotorreceptores, que son las células que se encargan de convertir la luz en estímulos nerviosos, es la vía final común e irreversible de muchas de estas formas de ceguera. Sin embargo, aunque durante los últimos 20 años se han podido clonar más de 100 genes diferentes, que son responsables de algunas de las degeneraciones retinianas hereditarias más importantes, y se han descrito tratamientos innovadores basados en terapias génicas, factores neurotróficos y factores nutricionales, la mayor parte de estos tratamientos todavía están en una fase clínico-experimental muy preliminar y aún no existe ningún tratamiento eficaz para estas patologías.

Una alternativa que podría ofrecer la posibilidad de recuperar la visión y/o la capacidad funcional de los receptores dañados en las retinas degeneradas son los trasplantes de células de epitelio pigmentario y de fotorreceptores [1]. En este contexto se han utilizado, con distintos grados de éxito, diversos tipos celulares pluripotenciales o células progenitoras [2] mayoritariamente procedentes de: neuronas retinianas embrionarias (fetales) o neonatales [3,4], progenitores en retina adulta presentes en el cuerpo ciliar y en la membrana basal del limbo esclero-corneal [5,6], progenitores neuronales del cerebro [7,8], células pluripotenciales procedentes de la médula ósea [9,10] y células pluripotenciales embrionarias [11,12]. Las principales propiedades de estas células son su capacidad para dividirse indefinidamente (autorenovación) y la posibilidad de diferenciarse en varias líneas celulares. Sin embargo, uno de los problemas más serios de esta aproximación es la obtención de un número de células aptas para el trasplante, que además puedan sobrevivir el tiempo necesario para restaurar dicha función.

Afortunadamente también aparecen células troncales o progenitoras en tejidos adultos. Estas células permanecen habitualmente quiescentes, pero pueden comenzar a dividirse y diferenciarse en células especializadas si se dan las

condiciones adecuadas. En el caso de las células del tejido adiposo existen además razones que las hacen muy atractivas para su uso en trasplantes debido a su bajo poder antigénico (ya que carecen de marcadores específicos de superficie) y a la posibilidad de obtener grandes volúmenes de tejido y de células sin necesidad de que sean cultivadas.

El uso de células mesenquimales del tejido adiposo está siendo muy utilizado para su diferenciación *in vitro* en células condrogénicas, adiposas e incluso neurales. Uno de nuestros objetivos consiste en comprobar si estas células son capaces de diferenciarse espontáneamente *in vivo* en células de la retina (mediante un proceso de transdiferenciación) y valorar si son útiles para regenerar los fotorreceptores dañados en un modelo animal que asemeja la retinosis pigmentaria. La hipótesis subyacente es que al introducir las células indiferenciadas en un tejido los diversos factores requeridos para el crecimiento celular existentes en ese ambiente tisular (en este caso una retina dañada o enferma) estimularían la diferenciación a una determinada línea celular [13,14].

Material y métodos

Los animales fueron tratados de acuerdo con la normativa de uso de animales para investigación en oftalmología y visión de la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) y la normativa estatal y europea vigente al respecto. Todos los procedimientos que se realizaron con los animales fueron aprobados y supervisados por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Extracción células mesenquimales

Seis ratones machos adultos B6 Tg (ACTB-EGFP, AcreGFP)/2Osb (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University) transgénicos para proteína verde fluorescente fueron sacrificados por dislocación cervical. A continuación se procedió a la extracción instantánea de la grasa inguinal y su lavado con suero salino fosfatado (PBS) estéril en placa Petri sobre hielo para eliminar restos de sangre, pelos y otro material contaminante.

El protocolo de extracción de las células mesenquimales [15] se inició con un lavado en PBS tras el que se introduce la grasa en el medio de cultivo que contiene DMEM 1000 mg/L glucosa, 10% suero fetal bovino (FBS); 1% penicilina y estreptomycin, 2,5 mg/ml anfotericina B y se incubó a 37°C durante una hora. Después se disgregó mecánicamente la grasa y se lavó 2 veces con PBS, tratándola a continuación con 0,75% colagenasa (tipo V, Sigma-Aldrich), en PBS, durante 45 min a 37°C con ligera agitación. La cola-

genasa se inactivó con el mismo volumen del medio descrito, centrifugando durante 5 min a 1500 rpm. El precipitado celular se resuspendió en medio y se filtró en una gasa estéril de 100 μm para eliminar los restos celulares. Con el material obtenido se procedió a la siembra en placas de cultivo convencionales (TPP, Trasadingen, Suiza) con el medio descrito. El cultivo se realizó bajo condiciones estándar (oxígeno atmosférico con 5% de CO_2 , a 37°C). Cuando las células alcanzaron un 70-90% de confluencia, se realizaron pases con tripsina cada 3-4 días y se sembraron a una densidad de 5000 células por cm^2 (Figura 1).

Para realizar los trasplantes de células se usaron ratones machos adultos rd10 (ratones con mutación espontánea en el exón 13 del gen *Pde6b* que se utilizan como modelo de

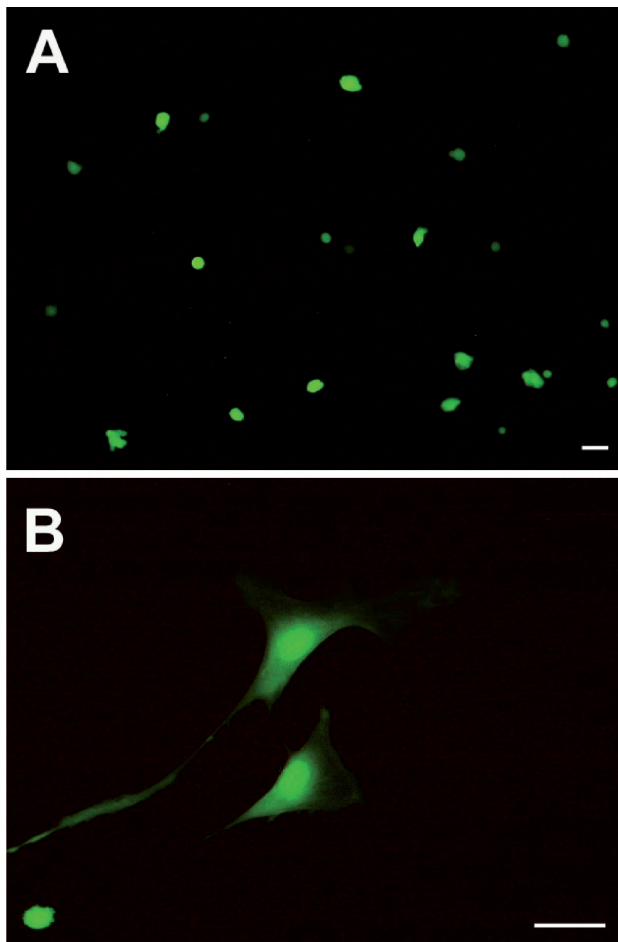


Fig. 1. Ejemplo de células mesenquimales adiposas. a) Suspensión celular, b) Células cultivadas (tras su manipulación con la jeringa de Hamilton) que conservan su aspecto indiferenciado y se adhieren a la placa (Calibración = 20 μm).

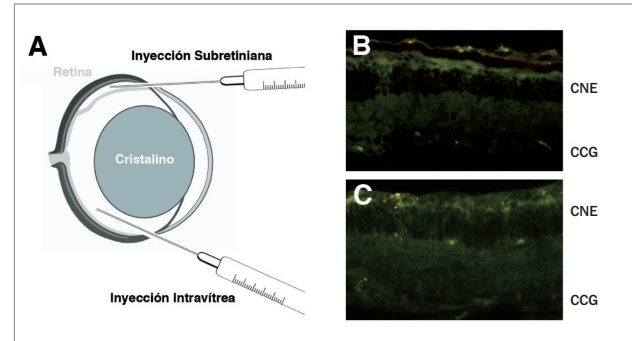


Fig. 2. Trasplante de células mesenquimales. a) Esquema de la técnica de trasplante en los espacios subretiniano y vítreo con ayuda de una jeringa de Hamilton. b) Imagen de microscopía de fluorescencia de células trasplantadas en el espacio subretiniano de un animal rd10. c) Células trasplantadas en el espacio vítreo. CCG, capa de células ganglionares. CNE, capa nuclear externa (Calibración = 100 μm).

retinosis pigmentaria de desarrollo lento). Estos ratones en su edad adulta sólo poseen una fila discontinua de bastones y conos aberrantes [16,17] y la degeneración de la retina empieza después de que ésta haya alcanzado su completa diferenciación.

Antes de realizar el trasplante los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina (70 mg/kg, Ketolar®, Pfizer, NY, USA) y Xilacina (10 mg/kg, Rompun®, Bayer, Alemania). A continuación se les indujo en ambos ojos una midriasis pupilar instilándoles una gota de tropicamida al 1% (Colicursi tropicamida 1%®, Alcon-Cusi, Barcelona, España) y fueron anestesiados tópicamente con una gota de Colicursi Anestésico Doble® (Alcon-Cusi, Barcelona).

Para estudiar la mejor vía de administración celular se utilizaron inyecciones subretinianas e inyecciones intravítreas (Figura 2). En ambos casos los animales fueron inyectados en el ojo izquierdo con 2 μl de una suspensión celular de células mesenquimales a una concentración de 25000 cel/ μl en medio de cultivo. Para ello se utilizó una jeringa Hamilton (Hamilton Company, Reno NV, USA) con una aguja con diámetro interno de 130 μm (calibre 26G). El ojo derecho se usó como control y sólo recibió el medio de cultivo en el que estaban suspendidas las células. Una vez realizadas las inyecciones se comprobó la correcta vascularización de la retina mediante fundoscopia directa. También se comprobó la viabilidad de las células inyectadas tras su manipulación. Para ello se sembraron 2 μl de la suspensión celular usada para el trasplante tras su paso por la aguja de la jeringa de Hamilton.

No se usaron inmunosupresores tras la inoculación debido a que la capacidad antigénica de las células mesenquimales adiposas es mínima, siendo éstas el tipo de células pluripotenciales con menor antigenicidad [18].

A los 27 días postimplantación, los ratones fueron sacrificados bajo anestesia mediante dislocación cervical. Se extrajeron ambos ojos y se fijaron en paraformaldehído al 4%, en PBS, durante toda la noche. Al día siguiente, se disecaron la córnea y el cristalino, y se volvieron a fijar durante 1 hora con paraformaldehído al 4% en PBS. Tras varios lavados en agua destilada fueron crioprotectados en gradientes de sacarosa y finalmente se incluyeron en OCT (Optimal Cutting Temperature). Posteriormente se realizaron cortes sagitales seriados de 7 μm con ayuda de un criostato (HM505E MICRON). Todos los cortes se montaron con un medio de montaje específico para fluorescencia (VectaShield, Vector Laboratories) y fueron observados y fotografiados con ayuda de un microscopio de fluorescencia (Olympus AX70).

Expresión de marcadores de fotorreceptores en muestras animales y cuerpos embrionarios

Para los análisis *in vivo* se seleccionó la cepa salvaje de ratón OF-1. Las muestras a analizar fueron ojos de embrión desde el estadio E9,5 hasta E18,5, ojos de ratones post-natales desde P1 hasta P10 y ojos de adulto. Una vez sacrificadas las hembras gestantes, se extrajeron los embriones y se aislaron los globos oculares con ayuda de unas tijeras extrafinas, tipo Castroviejo. Los ojos se lavaron en una solución estéril de PBS y se introdujeron en tubos *ependorf* para una congelación rápida con nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron en criocongelador a -80°C .

Para los análisis en cultivo se utilizó la línea comercial ES-D3 de células embrionarias pluripotenciales de ratón. Para mantener esta línea celular en un estado no diferenciado, se cultivaron las células con un medio de cultivo compuesto por: DMEM (Dulbeccos® MEM con Glutamax-1) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a una concentración final de 1x, complementado con 100 μM de Mercaptoetanol (Gibco), 15% de suero fetal bovino (Biochrom, Berlín, Alemania), 1000 U/ml de LIF (factor inhibidor de la leucemia) (Chemicon, Temecula, CA, USA), 100 U/ml de Penicilina-Estreptomomicina (Gibco) y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco).

El cultivo se realizó sobre placas de cultivo adherentes de 100 mm (TPP, Trasadingen, Suiza) tratadas con una solución de gelatina (Sigma, St Louis, MO, USA) al 0,1% en PBS estéril 1x, en una densidad de 1×10^6 células /10 ml. Se

cambió el medio cada día y se tripsinizaron las células (Trypsina- EDTA, Gibco) cada 3 días, cuando hubieron alcanzado una confluencia del 80%. La forma de tripsinizar las células fue siempre la misma, para las placas de 100 mm, se retiró el medio de cultivo y se hizo un lavado con PBS estéril; se eliminó el PBS de lavado y se añadieron 2 ml de tripsina, dejando actuar 1 minuto, a 37°C ; transcurrido el minuto, se bloqueó la reacción con 4 ml de medio de cultivo, homogeneizando la solución con la pipeta para disgregar los posibles agregados celulares. Esta solución se pasó a un tubo cónico estéril y se añadió de nuevo medio a la placa para realizar un lavado y recoger los posibles restos celulares, pasándolos también al tubo cónico. El recuento de las células se realizó mediante una cámara Neubauer, utilizando una dilución 1:1 de suspensión celular y una solución de azul tripán al 0,4% en PBS. De este modo se puede sembrar posteriormente el número adecuado de células.

Para obtener el cultivo de células en diferenciación espontánea se retiró el LIF del medio y el suero fetal bovino pasó a una concentración final del 10%. A continuación se tripsinizaron las células y se volvieron a cultivar en placas de cultivo no adherentes de 100mm (TPP) en una densidad de $2,5 \times 10^6$ células /10 ml con este medio carente de LIF. Esta técnica permite la diferenciación de las células en forma de cuerpos embrionarios. Estos cultivos de cuerpos embrionarios se mantuvieron 30 días, realizándose cambios de medio cada dos días y cambios de placa en los días tercero, quinto y séptimo y cuando fueron necesarios, para evitar la adherencia de los cuerpos embrionarios a la placa.

Los marcadores seleccionados para este estudio fueron los siguientes:

- Pax 6, Otx 2 y neurofilamento 200. Estos marcadores están presentes en el desarrollo embrionario de neuroectodermo y además Pax 6 y Otx 2 son genes esenciales para el desarrollo ocular.
- Notch 1, Chx 10, y Neuro D, que están implicados en neurogénesis retinal.
- Tr β 2, Crx, Nrl, que participan en procesos reguladores de la diferenciación a fotorreceptores.
- Rodopsina quinasa (Rhok), IRBP, Pdeb, arrestina (Sag), transducina (Gnat1, Gnat2), rodopsina (Rho), S-opsina, que marcan diferentes proteínas de transducción de conos y bastones.
- Periferina (Prph1), que es una proteína estructural de conos y bastones.

El diseño de cebadores se realizó a partir de secuencias encontradas en la literatura y comprobadas mediante el

Tabla 1. Marcadores utilizados para el estudio de expresión génica en cuerpos embrionarios de ratón

Marcador	Cebador 5'	Cebador 3'	Tamaño banda	Tm	Ciclos
Crx	CCCAATGTGGACCTGATGCACC	GGGCTGTAAGAATCTGAGAT	370bp	63°C	32
Chx10	CCGGGAGATGCTGGCCAT	TCCTCCTGCTCCATCTTGT	329bp	60°C	32
Gnat1	GAGGAGAAGCACTCCAGAGA	CTGAATCTCCATACTGAATG	261bp	57°C	32
Gnat2	CATCAGTGCTGAGGACAAAG	CAGCTTGGCTCTGCATAGTC	287bp	58°C	32
IRBP	CCCTCCCCAGAAGTCTTT	CAGCCTCTTCATGATGTA	425bp	55°C	32
NeuroD	CTTGCCCAAGAACTACATCTGG	GGAGTAGGGATGCACCGGGA	230bp	66°C	32
NF-200	GAGTGGTTCCGAGTGAGGTTGG	GACGTTGAGCAGGTCCTGGT	343bp	67°C	32
Notch1	TCTGGACAAGATTGATGGCTAC	CGTTGACACAAGGGTTGGAC	328bp	64°C	32
Nrl	GTGCCTCCTTCACCCACC	CAGACATCGAGACCAGCG	285bp	59°C	32
Otx2	CCATGACCTATACTCAGGCTTC	GAAGCTCCATATCCCTGGGTG	211bp	67°C	32
Pax6	AGTGAATCAGCTTGGTGGTG	TCTGTCTCGGATTTCCCAAG	294-336bp	60°C	30
Pdeb	CTTGCTACGCGGCTCTTC	CTTCACTCGTGAAGCATG	297bp	55°C	32
Prph1	CTGTCCCGCCTAGAACTGGAGC	GCCTCCCCACCCTTGGTCCC	291bp	67°C	32
Rho	TTCACCACCACCTCTACAC	CATTGCATGCCCTCAGGGATG	283bp	60°C	32
Rhok	ATATCCGAATTTCTGACC	CGCTTCTCCGGGTCCTTC	324bp	55°C	32
Sag	AAAAAGTGCAGCCAAACAGC	CATCTTTCTTCCCTTCTGTG	389bp	56°C	32
s-opsin	GCCCACTGCGCTACAAAAAGT	TGAAGCAGAAGATGAAGAGG	456bp	62°C	32
Trβ2	CAGTCCGGCTCTCAGTGGTC	CAGCCTTCACAGGTGATGCA	327bp	63°C	32

programa BLAST del NCBI o bien diseñadas a partir de las secuencias del ARN mensajero que se encuentran en las bases de datos del NCBI. Una vez obtenidas las secuencias, éstas se enviaron a Invitrogen para que sintetizaran los cebadores. Las secuencias de los cebadores utilizados y sus principales características se muestran en la Tabla 1.

La extracción de ARN de las muestras de ojos de ratón y de los cuerpos embrionarios se realizó mediante el reactivo Trizol Reagent® (Invitrogen), según el protocolo establecido por la casa comercial. Para realizar la retrotranscripción inversa de 1µg de cada uno de los ARN extraídos se utilizó: el kit de la enzima Expand Reverse Transcriptase® (Roche, Basel, Suiza), una solución de OligoDT (Roche), una solución de dNTP's (Innogenetics, Gent, Bélgica) y un inhibidor de ARNasa (RNase Out®, Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Así se generaron los ADN complementarios necesarios para poder realizar la reacción de PCR. Para todas las reacciones de retrotranscripción y PCR se utilizó el termociclador 96-Well GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

El análisis de los productos de amplificación de las PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa, al 2%, con Bromuro de Etidio para su visualización; y se utilizó un marcador de 100 pb (Invitrogen) para comprobar los tamaños de las bandas.

Resultados

Los cultivos obtenidos de células mesenquimales del tejido adiposo de ratón adulto, no perdieron su estado indiferenciado y se obtuvieron en gran número a partir de pocos gramos de grasa conservando su estado indiferenciado (Figura 1).

Las células trasplantadas en el espacio subretiniano de retinas distróficas son capaces de migrar por las distintas capas de la retina (Figura 2). Por el contrario, las retinas de los ojos control no muestran ninguna diferencia significativa con respecto a las retinas de ratones rd10 sin implantar.

En las retinas de los animales en los que el trasplante fue intravitreal también hemos observado alguna integración de las células en la capa nuclear externa (Figura 2). Las retinas de los ojos control tampoco mostraron diferencias significativas con respecto a retinas de ratones rd10 sin implantar.

En cuanto a la expresión en cuerpos embrionarios de marcadores tempranos y tardíos de retinogénesis y fotoreceptores, destacamos la expresión de Otx2, NF200, y Pax6 (fig. 3) y la expresión de periferina e IRBP (Figura 4). Estos marcadores concuerdan con los que expresan las células progenitoras de retina y ponen de manifiesto que estos genes también aparecen en cuerpos embrionarios en diferenciación espontánea. Todo ello indica que el estudio

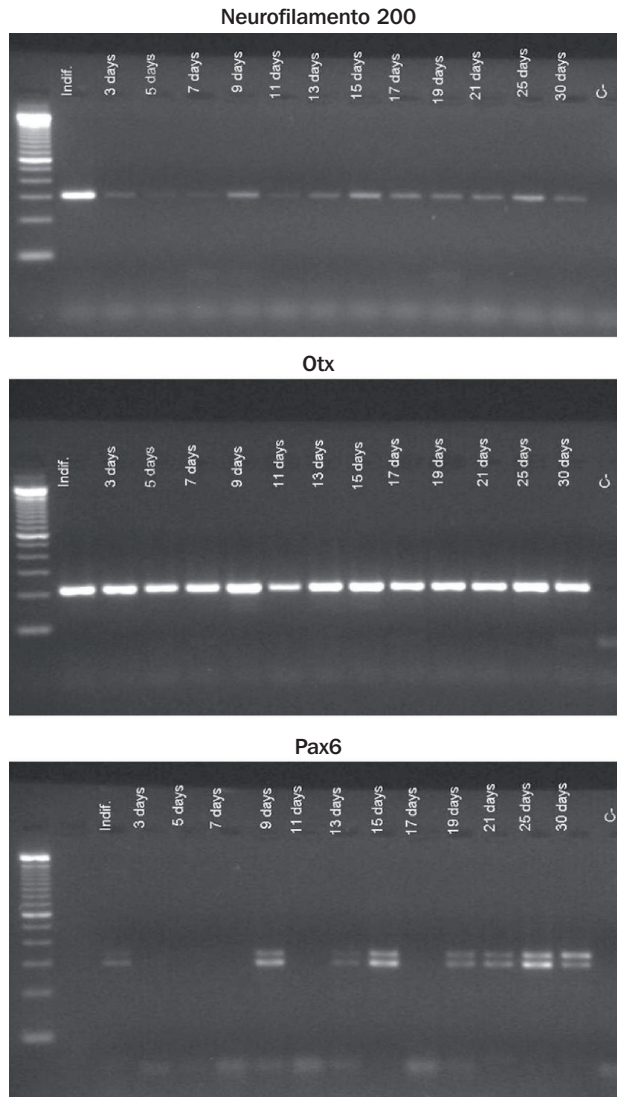


Fig. 3. Ejemplo de la evolución de la expresión de algunos marcadores tempranos y tardíos de retinogénesis y fotorreceptores (Otx2, NF200, y Pax6) en cuerpos embrionarios en diferenciación espontánea. c) control negativo. En extremo izquierdo del gel, marcador de talla desde 100 bp (banda inferior) aumentando 100 bp cada banda.

de marcadores en cuerpos embrionarios puede ayudar a comprender mejor los mecanismos reguladores de la diferenciación celular. Estos resultados también sugieren que los marcadores estudiados, o una combinación de ellos, pueden ser potencialmente útiles para la selección o inducción de líneas celulares capaces de ser utilizadas para el trasplante y la recuperación funcional de retinas degeneradas.

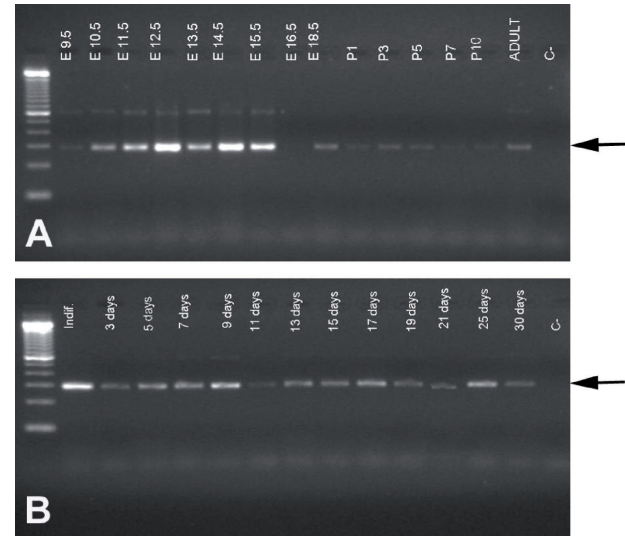


Fig. 4. Evolución de la expresión de periferina. a) Ratones pre- y post-natales. b) Cuerpos embrionarios en diferenciación espontánea. c) control negativo. En extremo izquierdo del gel, marcador de talla desde 100 bp (banda inferior) aumentando 100 bp cada banda.

Discusión

Aunque existen algunos datos experimentales que sugieren que los trasplantes de fotorreceptores pueden ser útiles para restaurar parcialmente la respuesta a la luz en ratones ciegos [19], no es posible extrapolar muchas de estas técnicas a clínica ya que la edad óptima para obtener las células a implantar corresponde aproximadamente al 2º trimestre de vida. Por otro lado, pese a que los mejores resultados de los trasplantes celulares se han obtenido con células progenitoras de retina, la limitación en cuanto al número de células obtenidas y lo complicado de su obtención (retinas neonatales, células del cuerpo ciliar...), además de su alto poder antigénico desaconsejan esta técnica para un futuro tratamiento de estas enfermedades en el hombre. En cualquier caso todos estos estudios han puesto de manifiesto que la edad del donante y el estadio en el que se encuentra la enfermedad son muy importantes de cara al resultado final, ya que parecen ser más efectivos cuanto más temprano es el trasplante [20].

En este trabajo hemos demostrado que si los cuerpos embrionarios son sometidos a protocolos adecuados de cultivo y diferenciación, aparecen células que expresan marcadores de retina. Estos protocolos también pueden aplicarse a células mesenquimales que podrían ser transfectadas con factores neurotróficos para inducir procesos de transdiferenciación antes del trasplante con el fin de mejorar la eficiencia de estas técnicas [19,21,22]. Por otro lado, el simple

contacto de estas células con el microambiente adecuado (retinas en proceso de degeneración) parece facilitar su supervivencia, migración e integración en la retina. A la vez, las células trasplantadas ayudan a proteger a los fotorreceptores y facilitan la regeneración de la retina mediante la liberación de factores tróficos específicos [23].

Los resultados de un estudio reciente en el que se realizó un trasplante autólogo de células mesenquimales del tejido adiposo en tejido cardíaco dañado de un paciente [24] demuestran que la extracción de este tipo de células es rápida y que es posible conseguir un número de células suficiente para el trasplante. Este procedimiento podría extrapolarse al tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina. Así, el aislamiento de la retina que le confiere una inmunoreactividad limitada privilegiada [25], unido a la baja inmunoreactividad de las células mesenquimales adultas del tejido adiposo, sugieren que el trasplante alogénico de células mesenquimales son interesantes en las estrategias terapéuticas del futuro, más teniendo en cuenta que hoy por hoy no existe ningún tratamiento curativo para estas enfermedades. Su extracción es sencilla dado que es un tejido fácilmente accesible y por tanto puede convertirse en un proveedor ilimitado de células para el tratamiento de defectos o injurias de tejidos autólogos o heterólogos. Además, pueden conseguirse fácilmente millones de células y no existen implicaciones éticas para su uso. Otra ventaja adicional de estas células es que presentan una tasa de multiplicación lenta y no tienen un gran poder proliferativo, por lo que su posible capacidad teratogénica está muy disminuida.

Finalmente, no hay que olvidar que aún estamos en unas fases muy preliminares de estas investigaciones y todavía hay que superar muchas dificultades antes de que estas técnicas puedan representar una opción terapéutica real para mejorar la calidad de vida de las personas que padecen estas patologías. Es preciso conocer mejor los procesos de crecimiento y diferenciación celular, y los mecanismos que controlan el desarrollo de los progenitores celulares. Además hay que conseguir que las células trasplantadas no sólo sobrevivan, sino que se integren en la retina, realicen las conexiones apropiadas y no degeneren.

Hemos elaborado un protocolo que permite la obtención, aislamiento y selección de un número suficiente de células mesenquimales de tejido adiposo para ser utilizadas para el trasplante y recuperación funcional de retinas que han sufrido procesos degenerativos. Nuestros resultados han puesto de manifiesto que una vez trasplantadas, estas células sobreviven, migran y se integran en la retina de ratones rd10. Estas células parecen reunir las condiciones necesarias (fácil obtención, número suficiente y bajo poder antigénico) para su potencial uso en este tipo de terapia celular, sin embargo todavía son necesari-

os más estudios para comprender mejor los procesos de crecimiento y diferenciación celular. En especial es preciso conocer las señales y factores tróficos que participan en estos procesos y utilizar este conocimiento para desarrollar estrategias de diferenciación dirigida. La posibilidad de usar estos factores para activar o dirigir la transdiferenciación de estas células hacia fotorreceptores, o incluso el análisis de los trasplantes de estos tipos celulares en retinas dañadas, nos ofrecerán nuevos datos para seguir avanzando en el prometedor campo de la terapia celular de las enfermedades neurodegenerativas.

Agradecimientos

Queremos agradecer a la FUNDACIÓN MAPFRE la Beca de Investigación 2006 otorgada y a la Cátedra de Investigación en Retinosis Pigmentaria «Bidons Egara» por su apoyo financiero en las distintas etapas de la realización de este trabajo. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang S, Lu B, Girman S, Holmes T, Bischoff N, Lund RD. Morphological and Functional Rescue in RCS Rats after RPE Cell Line Transplantation at a Later Stage of Degeneration IOVS 2008; 49:416-21.
2. Das AV, Zhao X, Ahmad I. Stem Cell therapy for retinal degeneration: retinal neurons from heterologous sources. *Semin Ophthalmol* 2005; 20:3-10.
3. Engelhardt M, Wachs FP, Couillard-Despres S, Aigner L. The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina in vitro. *Exp Eye Res* 2004; 78:1025-36.
4. Ahmad I, Das AV, James J, Bhattacharya S, Zhao X. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Semin Cell Biol* 2004; 15:53-62.
5. Akagi T, Takahashi M. Photoreceptors derived from adult iris tissue: prospects for retinal transplantation. *Semin Ophthalmol* 2005; 20:11-5.
6. Engelhardt M, Bogdahn U, Aigner L. Adult retinal pigment epithelium cells express neural progenitor properties and the neuronal precursor protein doublecortin. *Brain Res* 2005; 1040:98-111.
7. Kurimoto Y, Shibuki H, Haneko Y, Ichikawa M, Kurokawa T, Takahashi M, et al. Transplantation of adult rat hippocampus-derived neural stem cells into retina injured by transient ischemia. *Neurosci Lett* 2001; 306:57-60.
8. Van Hoffelen SJ, Young MJ, Shatos MA, Sakaguchi DS. Incorporation of murine brain progenitor cells into the developing mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:426-34.



9. Tomita M, Adachi Y, Yamada H, Takahashi K, Kiuchi K, Oyaizu H, et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells* 2002; 20:279-83.
10. Chiou S, Kao C, Peng C, Chen S, Tarng Y, Ku H, Chen Y. A novel in vitro retinal differentiation model by co-culturing adult human bone marrow stem cells with retinal pigmented epithelium cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 326:578-85.
11. Sugie Y, Yoshikawa M, Ouji Y, Saito K, Hara Y. Photoreceptor cells from mouse ES cells by co-culture with chick embryonic retina. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 332:241-7.
12. Banin E, Obolensky A, Idelson M, Hemo I, Reinhardt E, Pikarski E, et al. Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:246-57.
13. Pellegrini G, De Luca M, Arsenijevic Y. Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2007; 18:805-18.
14. Cheng LC, Tavazoie M, Doetsch F. Stem cells: from epigenetics to microRNAs. *Neuron* 2005; 46:363-7.
15. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang JI, Futrell WJ, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7:211-26.
16. Gargini C, Terzibasi E, Mazzoni F, Strettoi E. Retinal Organization in the Retinal Degeneration 10 (rd10) Mutant Mouse: A Morphological and ERG Study. *J Comp Neurol* 2007; 500:222-38.
17. Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res* 2002; 42:517-25.
18. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)* 2005; 26:2-8.
19. Dong X, Pulido JS, Qu T, Sugaya K. Differentiation of human neural stem cells into retinal cells. *Neuroreport* 2003; 14:143-6.
20. Djojoseburo MW, Arsenijevic Y. Retinal stem cells: promising candidates for retina transplantation. *Cell Tissue Res* 2008; 331:347-57.
21. Spence JR, Aycinena JC and Rio-Tsonis K. Fibroblast growth factor-hedgehog interdependence during retina regeneration. *Dev Dyn* 2007; 236:1161-74.
22. Haynes T, Gutierrez C, Aycinena JC, Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K. BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration. *PNAS* 2007; 104: 20380-5.
23. Meyer JS, Katz ML, Maruniak JA, Kirk MD. Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors. *Stem Cells* 2005; 24:274-83.
24. Sanchez PL, Sanchez-Guijo FM, Villa A, del Canizo C, Arnold R, San Roman JA, et al. Launching a clinical program of stem cell therapy for cardiovascular repair. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; (Suppl 1):S123-9.
25. Wallace VA. Stem cells: a source for neuron repair in retinal disease. *Can J Ophthalmol* 2007; 42:442-6.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.

ORIGINAL

Cribado de enfermedad celíaca en población infantil genéticamente seleccionada

Screening for celiac disease in children genetically selected

Cilleruelo M L ¹, Jiménez J ², Fernández S ¹, Arranz E ³, Garrote J A ³, Sánchez M ¹, Martín del Valle F ¹, Rayo A ¹, Blanco C ¹, Centeno M ¹, Hdo de Larramendi C ²

¹ Servicio de Pediatría. Hospital Severo Ochoa. ² Servicio de Bioquímica. Hospital Severo Ochoa. ³ Laboratorio de Inmunogenética. Facultad de Medicina de Valladolid

Resumen

La enfermedad celíaca (EC) se desarrolla exclusivamente en individuos genéticamente predispuestos. El objetivo de este estudio prospectivo ha sido determinar la prevalencia de EC en una cohorte de niños HLA-DQ2 positivos. Para ello se realizó en primer lugar el HLA-DQ2 en sangre de cordón umbilical del recién nacido y posteriormente la EC fue confirmada mediante estudio serológico (anticuerpos antiendomiso y antitransglutaminasa). De un total de 1716 recién nacidos participaron en el estudio 1291 (75,23%) de los cuales 361 (27,97%) fueron HLA-DQ2 positivos. La prevalencia de EC en este grupo de riesgo genético fue de 9,54%.

Palabras clave:

Enfermedad Celíaca, HLA-DQ2, cribado.

Abstract

Celiac disease (CD) is developed in only genetically susceptible individuals. The aim of this prospective study is to investigate the prevalence of CD in a cohort of HLA-DQ2 positive children. Firstly, we determined the HLA-DQ2 in umbilical cord blood and subsequently CD was confirmed by the positivity of serum antiendomysial antibodies and human tissue transglutaminase antibodies. From 1716 newborns 1291 (75,23%) were selected; 361 (27,97%) were HLA-DQ2 positives. In at-risk group the prevalence of CD was 9,54%.

Key words:

Celiac Disease, HLA-DQ2, screening.

Introducción

La enfermedad celíaca (EC) es una intolerancia permanente al gluten del trigo, cebada y centeno que se desarrolla en individuos genéticamente predispuestos dando lugar a una atrofia de la mucosa del intestino delgado mediada inmunológicamente [1]. Dicha lesión da lugar a una mala utilización de los nutrientes que se manifiesta clínicamente de manera tan variable que la enfermedad puede pasar desapercibida si no se mantiene una elevada sospecha diagnóstica [2]. La exposición permanente al gluten en individuos con EC condiciona un mayor riesgo de desarrollar enferme-

dades malignas, sobre todo localizadas en el tubo digestivo, además de otras enfermedades no mortales, pero de elevada morbilidad, como son la osteoporosis, esterilidad, alteraciones neuropsiquiátricas y enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus tipo 1 [2,3]. El tratamiento consiste en la exclusión estricta del gluten de la dieta lo que da lugar a la remisión completa de la sintomatología así como la recuperación del daño de la mucosa intestinal [4].

La EC tiene una base genética. Los principales factores de riesgo se relacionan con los genes de la región HLA de clase II localizados en el brazo corto del cromosoma 6 [5] en concreto el HLA-DQ2, codificado por los genes DQA1*0501 y DQB1*0201, y el HLA-DQ8 codificado por los genes DQA1*0301 y DQB1*0302 [6,7]. Estudios epidemiológicos recientes han demostrado que aproximadamente el 90% de celíacos de diferentes áreas geográficas

Correspondencia

J. Jiménez Jiménez
Hospital Severo Ochoa. Leganés. Madrid 28911
jjimenez.hsvo@salud.madrid.org

cas presentan el heterodímero DQ2; los celíacos DQ2 negativos se dividen al 50% entre que portan el heterodímero DQ8 y los que presentan la mitad del heterodímero DQ2, siendo extraordinariamente infrecuente (menos del 0,5%) que no presenten ninguno de los heterodímeros conocidos [8,9].

La aplicación de los tests serológicos en el diagnóstico de la enfermedad han posibilitado la realización de estudios epidemiológicos que han permitido conocer la auténtica prevalencia de la enfermedad, que se sitúa en 1/100-1/300 de la población general [10-15].

En la actualidad, se considera que la mejor aproximación epidemiológica en el diagnóstico de la EC es un proceso sistemático de búsqueda de casos entre aquellos pacientes que presenten los síntomas y asociaciones características de esta enfermedad y en los familiares de primer grado [16]. Sin embargo, se comienza a discutir actualmente la necesidad de un cribado activo en la población general [17] dado que esta enfermedad cumple todos los criterios requeridos por la OMS para ser una enfermedad susceptible de cribado masivo [18].

Se ha sugerido que el tipaje de HLA como primer paso del cribado de EC en pacientes de riesgo es conveniente desde el punto de vista coste-beneficio, ya que la negatividad del HLA-DQ2 y DQ8 excluye la EC de por vida mejor que la serología. En este modelo, el estudio serológico se aplicaría sólo a los individuos HLA-DQ2 o DQ8 positivos [19].

Los estudios realizados en sangre de cordón umbilical ha posibilitado la determinación de los HLA de riesgo de enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus [20] y, en un estudio publicado recientemente, la EC [21].

El objetivo de nuestro estudio ha sido determinar la prevalencia de EC en una cohorte de niños HLA-DQ2 positivos. Para ello se realizó en primer lugar estudio genético en sangre de cordón umbilical a todos los recién nacidos y posteriormente fue confirmada la existencia de EC mediante estudio serológico.

Material y métodos

Se trata de un estudio prospectivo en el que se incluyeron, por muestreo consecutivo no probabilístico, todos los recién nacidos en la maternidad del Hospital Severo Ochoa en el periodo comprendido entre Julio-2004 a Julio-2005. Participaron todos los recién nacidos vivos cuyos padres consintieron participar en el estudio. Se excluyeron aquellos recién nacidos con malformaciones congénitas graves incompatibles con la vida y aquellos cuya muestra de sangre fue insuficiente y no permitía la extracción adecuada de DNA.

Se utilizó la sangre que habitualmente se extrae del cordón umbilical de todos los recién nacidos para la determinación del hematocrito. Como muestra de seguridad, ante la posibilidad de fallo en la extracción del DNA, se utilizó la sangre de cordón que se emplea para la determinación del Rh y grupo sanguíneo. Las muestras de sangre se conservaron un máximo de 72 horas; durante este tiempo, los pediatras solicitaron el consentimiento a los padres indicando posteriormente al Servicio de Bioquímica que muestras debían ser estudiadas.

Se determinó la presencia de los alelos DQA1*0501 y DQB1*0201 mediante la técnica PCR/SSP según protocolo descrito por Olerup [22]. La extracción de DNA se realizó mediante tecnología de partículas magnéticas, BioRobot EZ1 (Izasa).

Una vez establecida la cohorte de niños HLA-DQ2 positivos se contactó telefónicamente con las familias a partir de los 2 años de edad del niño con el fin de valorar los posibles síntomas sugestivos de la EC y recabar su permiso para la realización del estudio serológico.

Para realizar el cribado se utilizó un test inmunocromatográfico determinando autoanticuerpos antitransglutaminasa tisular humana IgA/IgG/IgM (Operon-Tec-Laim S.A.). A los pacientes positivos se les efectuó una extracción de sangre venosa en la que se determinó: Inmunoglobulina A mediante nefelometría (BN II, Siemens), anticuerpos antiendomisio tipo IgA (BioSystems, Atom) y anticuerpos antitransglutaminasa tipo IgA (Celikey IgA. Immuno-Cap250 Phadia). En aquellos niños con déficit de inmunoglobulina A (valor inferior a 10 mg/dl) se efectuaron los mismos anticuerpos de clase IgG.

Se calculó el número total y porcentajes de positividad, tanto para el HLA-DQ2 como para la serología de EC, y su distribución por sexos.

Resultados

Desde Julio de 2004 a Julio de 2005 nacieron en nuestra maternidad 1716 niños de los cuales cumplieron los criterios de inclusión 1291 (620 niñas y 671 niños) que supone un 75,23% de la población de recién nacidos.

El HLA-DQ2 fue positivo en 361 lo que supone un 27,96% de la población; 161 eran niñas y 200 niños. El HLA-DQ2 fue negativo en 930 niños; 459 niñas y 471 niños.

De los 361 niños HLA-DQ2 positivos 262 (72,57%) completaron el estudio. A estos niños se les realizó el cribado inicial de EC mediante test inmunocromatográfico siendo 26 positivos. Se confirmó la positividad mediante serología en 25 pacientes, 18 niñas (75%) y 7 niños



(25%). Esto supone un 9,54% de posibles celíacos en la población de riesgo.

De los 25 niños con serología positiva, sólo 5 presentaba una sintomatología característica de EC siendo el resto asintomáticos.

Discusión

Se trata del primer estudio español de detección de enfermedad celíaca en población genéticamente susceptible con el fin de detectar precozmente la enfermedad.

Es de destacar el enorme interés de los padres hacia el estudio que se refleja en el alto porcentaje de participación que llegó a un 75,23% de las familias. Se trata de una importante colaboración, dado que se contaba con que un porcentaje de la población se perdería al existir fines de semana y periodos de vacación en los que fue imposible informar a las familias y pedir su inclusión en el estudio.

Es práctica habitual extraer sangre de cordón umbilical a todos los recién nacidos para valorar la situación hematológica del niño. Esta muestra es de gran interés para estudios de cribado debido a que no supone una agresión añadida al neonato. Por esta razón aprovechamos esta muestra para realizar estudio genético de la enfermedad celíaca mediante determinación de HLA-DQ2 que incluye más del 95% de la población de enfermos celíacos. En nuestra experiencia el otro HLA de riesgo asociado a EC, el HLA-DQ8, sólo se encuentra en el 1% de los niños celíacos por tanto, debido a su bajo rendimiento, se decidió no realizar su determinación basándonos en el estudio previo [23]. En nuestra población de recién nacidos el 27,96% presentan el HLA-DQ2 positivo. Este porcentaje era el esperado y es similar al encontrado en la bibliografía que llega a un máximo del 30% [6].

Una vez seleccionada esta cohorte de niños con riesgo genético se contactó nuevamente con la familia, tal y como se había indicado cuando se solicitó el consentimiento informado, a partir de los dos años de edad del niño. En este momento se considera que el rendimiento del estudio serológico es mayor, sobre todo en pacientes con escasa sintomatología. Se efectuó contacto telefónico consiguiendo localizar a 262 familias que suponen el 72,57% de la población seleccionada. Este porcentaje es elevado dada la dificultad que supone el contacto al transcurrir dos años desde el comienzo del estudio y perder una parte de la población por haber cambiado de área sanitaria.

Debido a la edad de los niños, y con el propósito de obtener la mayor participación posible, se eligió un test inmunocromatográfico rápido y poco invasivo que consistió en la determinación de anticuerpos antitransglutaminasa en una gota de sangre obtenida mediante punción del dedo

pulgar. Mediante esta determinación 26 niños tuvieron un resultado positivo. Según el diseño de nuestro estudio, en ese mismo momento, se ofertaba a la familia la posibilidad de realizar estudio serológico mediante extracción de sangre venosa.

De los 26 niños seleccionados mediante test rápido se confirmó en 25 la presencia de anticuerpos antiendomiso y antitransglutaminasa. No existió ningún paciente con déficit de IgA. La concordancia entre el test inmunocromatográfico y las pruebas serológicas fue del 96,15%.

En nuestra población seleccionada por riesgo genético hemos encontrado una prevalencia de EC de 9,54%. En el estudio de Hoffenberg y cols [21] que estima la frecuencia de EC en niños en la población general de Denver, se realiza seguimiento de 987 pacientes seleccionados por HLA de riesgo a lo largo de cinco años y encuentran una frecuencia del 2% de niños con serología positiva para la EC. Esta cifra es claramente inferior a la nuestra aunque hay que considerar que nuestros pacientes están aún en seguimiento y el porcentaje podría disminuir. No obstante nos parece altamente improbable llegar a este porcentaje ya que supondría la negativización de 20 pacientes.

De los 25 niños con serología positiva, cinco presentaban síntomas de EC clásica y el resto era silente desde el punto de vista clínico aunque analíticamente 8 presentaban ferropenia sin anemia.

En el momento actual se especula con la posibilidad de realizar cribado poblacional de EC, no obstante hay que considerar que la mayoría de nuestros pacientes están asintomáticos o tienen leves alteraciones analíticas. Por este motivo estos niños están en fase de seguimiento realizando una dieta normal para poder valorar cual es la evolución de estos pacientes lo que contribuirá al conocimiento de la historia natural de la enfermedad. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sollid L, Lundin K. Coeliac disease: An inappropriate immune response. *Lancet* 2001; 358:513.
2. Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential. *Gut* 1993; 34: 150-1.
3. Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1999; 117:297-303.
4. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001; 120:636-51.

5. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('Celiac Sprue'). *Gastroenterology* 1992; 102:330-54.
6. Sollid LM, Markusen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ \cdot -, heterodimer. *J Exp Med* 1989; 169:345-50.
7. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993; 105:910-2.
8. Karelk K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the european genetics cluster on celiac disease. *Hum Immunol* 2003; 64:469-77.
9. Polvi A, Arranz E, Fernández-Arquero M, Collin P, Maki M, Sanz A et al. HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol* 1998; 59:169-75.
10. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994; 343:200-3.
11. Meloni G, Dore A, Fanciulli G, Tanda F, Bottazzo GF. Sub-clinical coeliac disease in schoolchildren from northern Sardinia. *Lancet* 1999; 353:37.
12. Csizmadia C, Mearin ML, Von Blomberg B, Brand R, Verloove-Vanhorick P. S. An iceberg of childhood coeliac disease in the Netherlands. *Lancet* 1999; 353:813-4.
13. Riestra S, Fernández E, Rodrigo L, García S, Ocio G. Prevalence of celiac disease in the general population of Northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:398-402.
14. Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T et al. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 2003; 348:2517-24.
15. Cilleruelo ML, Román E, Jiménez J, Rivero MJ, Barrio J, Castaño A, Campelo O, Fernández A. Enfermedad celíaca silente: explorando el iceberg en población escolar. *An Esp Pediatr* 2002; 57:321-6.
16. Hin H, Bird G, Fisher P. Coeliac disease in primary care: case finding study. *BMJ* 1999; 318:164-7.
17. Fasano A. European and North American populations should be screening for coeliac disease. *Gut* 2003; 52:168-9.
18. WHO mass screening recommendations: <http://www.who.int/en/>
19. Csizmadia CG, Mearin ML, Oren A, Kromhout A, Crusius JB, von Blomberg BM, et al. Accuracy and cost-effectiveness of a new strategy to screen for celiac disease in children with Down syndrome. *J Pediatr* 2000; 137:743-4.
20. Rewers M, Bugawan TL, Norris JM, Blair A, Beaty B, Hoffman M et al. Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetologia* 1996; 39:807-12.
21. Hoffenberg EJ, MacKenzie T, Barriga KJ, Eisenbarth GS, Bao F, Haas JE et al. A prospective study of the incidence of childhood celiac disease. *J Pediatr* 2003; 143:308-14.
22. Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 1993; 41:119-34.
23. Cilleruelo ML, Jimenez J, Román E, Bornstein B, Arranz E, Garrote JA, H. Larramendi C. Estudio coste-efectividad de la aplicación del diagnóstico genético en la valoración de la enfermedad celíaca. *Mapfre Medicina* 2006; 17:234-312.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.

I CASO CLÍNICO

Colgajo braquiorraquial en la cobertura de la inserción distal del tendón del bíceps

Brachioradial flap for coverage of the distal insertion of the biceps tendon

Valbuena C, Ballesteros A, Cendagortagarza J

Centro intermutual de Euskadi, Bilbao

Resumen

El músculo braquiorradial es un músculo flexor accesorio del codo que también se puede utilizar para dar la cobertura sin provocar un déficit funcional. Está indicado en la cobertura de los defectos complejos de la cara anterior y lateral del codo, especialmente cuando existe exposición articular, y también del tercio proximal del antebrazo.

Se presenta el caso de un varón de 49 años de edad con un problema de cobertura en la región anterior de codo tras una reinserción de bíceps distal 4 semanas antes, mediante anclaje en tuberosidad bicipital.

El colgajo de músculo braquiorradial es seguro, está bien vascularizado y es fácil de realizar, con una mínima morbilidad.

Palabras clave:

Codo, colgajo braquio-radial, defecto cutáneo.

Abstract

The brachioradial muscle is an accessory flexor muscle of the elbow that may also be used for coverage without causing functional deficit. It is indicated for covering complex defects in the anterior and lateral aspects of the elbow, particularly when joint exposure exists, and also in the proximal third of the forearm.

The case of a 49-year-old male with a coverage problem in the anterior elbow region 4 weeks after distal biceps reinsertion by anchoring in the bicipital tuberosity is reported.

The brachioradial muscle flap is safe, well vascularized, and easy to perform with minimum morbidity.

Key words:

Elbow, brachioradial flap, skin defect.

I Introducción

El codo tiene unas necesidades de cobertura diferente a otros territorios por la demanda funcional que tiene esta articulación. Cuando la pérdida de sustancia es considerable se utiliza un colgajo antebraquial radial de flujo directo, el fasciocutáneo a flujo directo basado en la arteria interósea posterior, el colgajo fasciocutáneo ante-cubital y colgajos musculocutáneos de anconeo y braquiorradialis [1-3].

El músculo braquiorradial es un músculo flexor accesorio del codo que también se puede utilizar para dar la cobertura sin provocar un déficit funcional. El arco de rotación permite una cobertura desde la cara lateral del codo hasta el olécranon. Así mismo, se puede utilizar como colgajo músculo-cutáneo. El colgajo del músculo braquiorradial se corresponde con un tipo II en la clasificación de Mathes y Nahai, llegando el aporte sanguíneo por diferentes pedículos. El pedículo proximal, el más importante, viene de la arteria recurrente anterior de la arteria radial, por el surco bicipital, en la profundidad del músculo. Este pedículo es suficiente para suplir aporte a todo el músculo, por lo que es el que se conserva en la disección del colgajo. Existen otros pedículos más pequeños, en número de 2 a 4, proce-

Correspondencia

C. Valbuena Esteban
Servicio de COT de Centro Intermutual de Euskadi,
Fontecha y Salazar 6. 48007 Bilbao
cristina_valbuena@yahoo.es

dentos de la arteria radial que se pueden considerar accesorios ya que no constituyen una vascularización relevante cuando el pedículo proximal está dañado. Por su parte, el aporte nervioso deriva del nervio radial a través de 2 ó 3 pequeñas ramas procedentes del surco bicipital.

Este tipo de colgajo está indicado en la cobertura de los defectos complejos de la cara anterior y lateral del codo, especialmente cuando existe exposición articular, y también del tercio proximal del antebrazo.

Caso clínico

Varón de 49 años que se presenta con un problema de cobertura en la región anterior de codo tras una reinserción de bíceps distal 4 semanas antes, mediante anclaje en tuberosidad bicipital.

A la exploración presentaba un hematoma en la cara anterior de codo, a pesar del drenaje postquirúrgico, desarrollando posteriormente una necrosis cutánea y un defecto cutáneo en cara anterior del codo con exposición de tendón distal del músculo bíceps braquial (Figura 1).

Se decidió cubrir el defecto con una cobertura mediante colgajo del músculo braquiorradial.

Bajo anestesia troncular y manguito de isquemia, se efectuó un desbridamiento de los restos cutáneos necróticos, con lavado intensivo de la herida y levantamiento, mediante incisión longitudinal, de la cara anterexterna del tercio proximal del antebrazo, para obtener el colgajo muscular del músculo braquiorradial (Figura 2). Sobre el plano muscular se colocó un injerto cutáneo, obtenido con dermatomo de la cara anterior del antebrazo.

En la fijación del colgajo se efectuó un ligero solapamiento del músculo bajo los bordes de piel sana circundante para conseguir un sellado del defecto durante la cicatrización (Figura 3). Se colocó una férula braquio-antebraquial y se



Fig. 1. Defecto cutáneo en cara anterior de codo tras reinserción distal de tendón del bíceps.

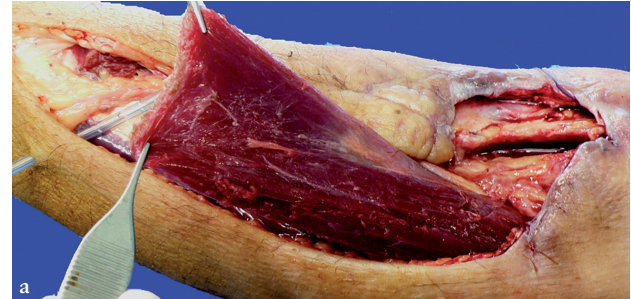


Fig. 2. a) Disección de colgajo de músculo braquiorradialis y b) posterior cobertura de cara anterior de codo.

mantuvo durante 2 semanas, permitiendo la cicatrización del colgajo con el tejido circundante.

La evolución postquirúrgica discurrió sin complicaciones. Inicialmente presentó una leve rigidez de la articulación del codo que cedió con sesiones de fisioterapia.

A los tres meses de la cirugía encontramos un buen aspecto de la herida y una función normal, tanto del bíceps rein-



Fig. 3. Solapamiento del músculo por debajo de bordes de piel sana circundante.



Fig. 4. Movilidad de codo en último control.

sertado como de la articulación del codo, presentando una movilidad de codo 0°-135° (Figura 4).

Discusión

La zona a cubrir presentaba el tendón expuesto por lo que no estaba indicada la cobertura con injerto cutáneo. Podrían utilizarse colgajo libres vascularizados u otros colgajos musculares cuya utilización provocaría un mayor déficit funcional. La utilización de colgajos libres vascularizados exige una técnica más compleja, además el uso de colgajos musculares ofrecen un mayor aporte vascular.

El colgajo de músculo braquiorradial es seguro, está bien vascularizado y es fácil de realizar, presentando una mínima morbilidad siempre que se tomen las debidas precaucio-

nes sobre la arteria y el nervio radial superficial adyacentes. No conviene realizarlo como colgajo miocutáneo por el defecto estético que provoca y por la desprotección tanto de la arteria y como del nervio radial. Por último, se trata de un colgajo de rotación con posibilidad de cobertura de cara anterior, posterior, externa de codo y de la zona proximal de antebrazo y distal del brazo. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gilbert A, Restrepo J. Le long supinateur. Anatomy utilisation comme lambeau de rotation muscular. *Ann Chir Plast* 1980; 25:72-5.
2. McGeorge DD, Arnstein PM, Stilwell JH. The distally based brachio-radialis muscle flap. *Br J Plast Surg* 1991; 44:30-2.
3. Binns M, Kueh KA, Pho RW. Brachioradialis forearm flap in a case of traumatic bone and skin loss at the elbow. *J. Hand Surg* 1990; 15B:317-9.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.