

INSTITUTO DE ESPAÑA

ANALES
de la
REAL ACADEMIA
NACIONAL
DE
FARMACIA



2001

VOLUMEN LXVII

Núm. 3

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

28004 MADRID

Regulación del crecimiento: axis GH/IGFs e hipótesis neuroendocrina¹

A.M. PASCUAL-LEONE

*Instituto de Bioquímica (C. mixto CSIC-UCM).- Facultad de
Farmacia.- Universidad Complutense.- Madrid*

RESUMEN

La regulación del crecimiento, tanto en etapas fetales como postnatales, es absolutamente dependiente del balance energético. El crecimiento es un complejo proceso dinámico que permite a un niño retrasarlo, cuando las circunstancias le son adversas, o relanzarlo, con velocidad acelerada cuando cesan; todo ello a fin de alcanzar la curva patrón de crecimiento característico de su especie. Ello supone la existencia de un control central, cerebral, del crecimiento. El primer nivel para el control del balance energético es el control del apetito. Hoy comenzamos a conocer el control cerebral del apetito. En el hipotálamo existen rutas orexigénicas y anorexigénica que controlan la apertura o cierre del apetito respectivamente. La substancia más fisiológica orexigénica es el neuropéptido Y (NPY), secretada en el núcleo arcuato, y la anorexigénica es la leptina secretada en el tejido adiposo. El apetito se regula según un sutil mecanismo entre dichas substancias en los núcleos hipotalámicos. Actualmente se desconocen las rutas moleculares por las cuales actúan. La leptina, que parece ser el sensor cerebral del balance energético, está también implicada en el crecimiento fetal cuando el control del apetito no es necesario. El NPY y la leptina son regulados en roedores por la insulina. En humano, la leptina es regulada además por otros metabolitos; entre los cuales los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) parecen ser un buen candidato, ya que son secretados en el cerebro, implicados en el crecimiento del cartílago, y además disminuyen con la subnutrición, pero, sin embargo, sus receptores aumentan en el cerebro en estados subnutridos. Desconocemos muchas cosas en

¹Conferencia impartida en la Real Academia de Farmacia el 18 de Mayo de 2000

el momento actual, pero la hipótesis neuroendocrina de Tanner, elaborada para explicar el control cerebral del crecimiento, en 1963, parece confirmarse, por los conocimientos que tenemos hoy, en el control neural del apetito.

Palabras clave: Regulación del crecimiento.- Axis GH/IGFs e hipótesis neuroendocrina.

SUMMARY

Regulation of growth: GH/IGFs axis and hypothesis of tanner

Regulation of growth, both in fetal and neonatal stages, is absolutely dependent on the energy balance. Growth is a complex process which permits both its retardation in adverse circumstances and the accelerated catch up to reach standard values when the conditions favor it. This precise regulation indicates the presence of a central control at the brain level. The first step in the control of the energetic balance is the control of appetite, which understanding is starting nowadays. Orexigenic and anorexigenic pathways produced at the hypothalamus regulate the switch on or off respectively of the sensation of appetite. Neuropeptide Y (NPY) secreted by the arcuate nucleus is the orexigenic compound most interesting whereas leptin, secreted by the adipose tissue, is the physiological anorexigenic endogenous substance. Both regulate appetite in a subtle manner involving complex molecular mechanisms yet to unravel. There is ample evidence that leptin, which is the brain sensor for the energetic balance, is also involved in the fetal growth when control of appetite is not necessary. Both NPY and leptin are regulated by insulin in rodents. In humans, leptin seems to be regulated by other metabolites; in particular, insulin-like growth factors (IGFs) are excellent candidates for leptin regulation since they are secreted within the brain, regulate somatic growth at the cartilage and their circulating levels decrease in conditions of undernutrition while the brain IGFs receptors increase. Although much research is needed in this area, the neuroendocrine hypothesis of Tanner, elaborated in 1963 to delineate the brain regulation of growth, stands today as the most plausible explanation for the control of appetite and its role in mammal growth.

Key words: Regulation of Growth.- GH/IGFs axis and neuroendocrine hypothesis.

1.- INTRODUCCIÓN

En periodo embriológico, el programa genético es primordial para el crecimiento, pero, aún entonces, determinados factores, llamados ambientales, son capaces de influir y modularlo de forma decisiva. Los

factores ambientales inciden en el programa genético endocrino alterando la secreción de hormonas que regulan el crecimiento. Entre dichas hormonas las más importantes en periodo fetal son la insulina, las hormonas tiroideas y los factores de crecimiento similares a la insulina, y las tres disminuyen con la subnutrición (1,2,3). El estudio de las alteraciones adquiridas del desarrollo (Tabla 1) muestra que en los modelos experimentales establecidos *in vivo* para dicho estudio, desequilibrios hormonales y subnutrición, la alteración del metabolismo glucídico, con merma de nutrientes, es un denominador común en ambas situaciones. Todas las causas de retraso intrauterino descritas en clínica (Tabla 2), parecen ser consecuencia de merma de nutrientes al feto: daño en la placenta, disminución de flujo placentario o desequilibrios hormonales que alteran el metabolismo glucídico. Pero, además, las causas que se describen como provocadoras de retraso de crecimiento en vida postnatal son también (Tabla 3) o bien consecuencia de un retraso intrauterino por desequilibrios hormonales que repercuten en el metabolismo o bien claramente malnutrición.

TABLA 1

Las alteraciones adquiridas del desarrollo se estudian en modelos animales. En dichas alteraciones siempre existe una gran alteración del metabolismo glucídico.

ALTERACIONES ADQUIRIDAS DEL DESARROLLO

A) Desequilibrios hormonales.

- A.1) Específicos:
Interacción de hormonas con genoma.
- Diferenciación sexual.
- Activación de enzimas gastrointestinales.

A.2) Alteración del metabolismo glucídico: Reducción de nutrientes.

B) Malnutrición

- B.1) Reducción de substratos energéticos
B.2) Alteración metabolismo glucídico: reducción de nutrientes.

Así pues, debemos concluir que tanto en etapa fetal como postnatal, la falta de nutrientes es el factor ambiental más importante regulador del crecimiento. Dicho de otro modo, el crecimiento es un proceso programado genéticamente, pero dependiente y regulado por el balance energético.

TABLA 2

Factores que provocan retardo de crecimiento fetal y que tienen como denominador común la falta de nutrientes.

- Malnutrición materna
- Reducción de flujo placentario
- Reducción tamaño placenta
- Administración corticoides y T₄ (desequilibrios graves del metabolismo glucídico)
- Ablación pancreática (disminución de insulina, alteración metabolismo glucídico)

TABLA 3

Alteraciones primarias del crecimiento posnatal

- Malnutrición
- Enfermedades celíacas (mala absorción)
- Deficiencia de GH
- Hipotiroidismo
- Exceso de corticoides
- Retraso intrauterino

1.2.- Características del crecimiento en los mamíferos

El crecimiento se puede definir como un proceso regulado por una cambiante alta velocidad que se extiende desde la infancia a la edad adulta. Además el crecimiento se produce según un complejo sistema por el cual el niño que crece vuelve a su pauta de crecimiento cuando por alguna circunstancia adversa ha habido un retraso. El retraso de crecimiento a una determinada edad se pone de manifiesto gracias a que el crecimiento está "canalizado" (4). La canalización se puede definir como la tendencia a guardar una estricta y predicha pauta de crecimiento. En términos clínicos, la canalización significa que el individuo crece según un esquema característico de cada especie, con desviaciones individuales en cada edad,

es decir, cada persona crece con unas curvas paralelas a las preestablecidas para su especie. Antes de la pubertad, las curvas individuales se apartan muy poco de la curva percentil preestablecida. Después de la pubertad, los cambios individuales son más amplios. En humano puede apreciarse un crecimiento acelerado hasta los tres años, un estancamiento posterior, y una aceleración en la pubertad. El hecho de existir en los mamíferos esos esquemas, predichos y establecidos en cada especie, es lo que permite apreciar que un niño tiene a una determinada edad un retardo. Estos retrasos del crecimiento se producen por circunstancias adversas: un desequilibrio hormonal, una infección, y siempre en estados de malnutrición provocados por diversas causas.

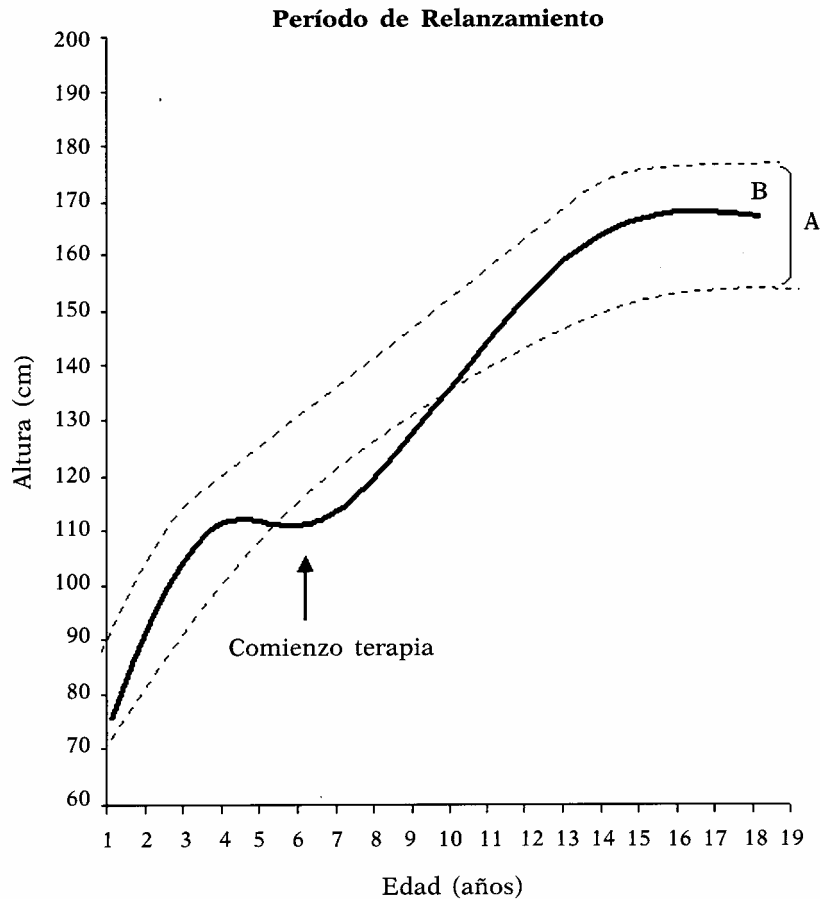
En el crecimiento se deben considerar dos vertientes: la estatura y el peso. Sin embargo ambas están enormemente relacionadas. Hay datos clínicos que muestran que niños retrasados en su estatura por malnutrición no consiguen crecer, en talla, hasta que no recuperan el 80% de su peso. Así pues, el crecimiento es un proceso dinámico y sometido a una gran elasticidad. La elasticidad del crecimiento se aprecia ya en periodo fetal. Un feto deja de crecer cuando las circunstancias le son adversas, y luego relanza el crecimiento cuando las circunstancias varían. Dicha elasticidad se aprecia sobre todo en la capacidad de relanzar el proceso de crecimiento, con velocidad acelerada, cuando las circunstancias adversas cesan, el fenómeno se denomina por los anglosajones "catch-up" (4,5).

2.- "CATCH-UP GROWTH" O RELANZAMIENTO DEL CRECIMIENTO.

La capacidad de reemprender el crecimiento, después de una etapa de retardo producida por causas patológicas, fundamentalmente por merma de nutrientes, "catch-up", nosotros lo denominaremos relanzamiento. La capacidad de relanzamiento (Figura 1) consiste en acelerar el crecimiento, con velocidad incrementada, cuando la terapéutica correspondiente suprime la causa que provocaba el retardo. Esta capacidad de relanzamiento no puede ser confundida con un crecimiento compensatorio, ya que éste se realiza para suplir una falta de masa actual, por ejemplo, la mutilación de un órgano, mientras que el relanzamiento a que nos referimos consiste en que se provoca frente a un retardo potencial, que se produciría si se sigue creciendo con la velocidad disminuída. La clínica proporciona datos que

permiten establecer las circunstancias en las cuales la recuperación se efectúa peor (Tabla 4). Observando el crecimiento, puede establecerse que en los animales con largo periodo de retardo, o bien con disminución muy drástica del crecimiento, o cuando este retardo se produce en animales muy inmaduros, el relanzamiento de crecimiento se efectúa peor, y existen diferencias por el sexo; los machos recuperan peor su crecimiento que las hembras. Este fenómeno, esta capacidad de relanzar el crecimiento, que es conocido por la clínica desde hace tiempo, no fue sin embargo abordada con método científico, de forma rigurosa, hasta 1963 por Tanner (6). Anteriormente hubo un precedente en 1957 por Weiss (7). Weiss se preguntó qué regía el crecimiento a nivel de tejidos, e imaginó la existencia de sustancias que inhibían y regulaban su crecimiento, les llamó inhibidores. Sin embargo, fue Tanner, en 1963, el que observó rigurosamente el fenómeno, estableciendo lo que se ha dado en llamar "hipótesis neuroendocrina" de Tanner (6). Observó el hecho de que el relanzamiento del crecimiento se produce de un modo global y armónico en

Figura 1.- A: Franja predicha de crecimiento en el hombre. B: Línea de crecimiento retardada a los tres años y relanzada a los 6, después de comenzada la terapéutica.



to
 dos los tejidos del organismo, y ello supone un control central del crecimiento. La existencia de un tamaño-diana, "target-size", característico de cada especie, o curva patrón de crecimiento, "time tally", supone que dicha curva, característica de cada especie, está plasmada en algún lugar del cerebro. Tanner, ante estas consideraciones, imagina que la pauta de crecimiento característica de cada especie se cumple mientras llega al cerebro, procedente de la periferia, una substancia para la cual existen receptores cerebrales, y que señala la situación exterior; nivel de nutrientes, peso corporal adecuado para crecer, etc. Tanner llama a dicha substancia inhibidor, tomando la nomenclatura establecida por Weiss (7). Imagina que, mientras los receptores cerebrales de dicha substancia están saturados en el

cerebro, el individuo crece normalmente, y cuando la concentración del inhibidor desciende y comienzan a encontrarse receptores no saturados, se detiene el crecimiento porque éstos están comunicando al cerebro que la situación no es buena en la periferia. Todo ello está representado en la figura 2. La hipótesis neuroendocrina de Tanner es muy sugestiva, y muy creativa, sólo que en 1963 (6) no se conocía ninguna sustancia que pudiera ser el tal inhibidor. Durante años, se buscó, sin encontrar, la tal sustancia que llegara al cerebro y rigiera el crecimiento normal, o bien indicara que éste debía retardarse. Se intentó, sin ningún éxito, ver si dicho "inhibidor" podía ser la hormona de crecimiento o la insulina, ambas implicadas en el crecimiento. Por ello, Barón et al. en 1994 (8) elaboraron su hipótesis "crecimiento de la placa ósea". Dicha hipótesis se basa en el hecho de que los huesos largos tienen una jerarquización rígida de placas celulares constituida por: zona germinal, zona proliferativa, zona hipertrófica y zona calcificada. Los condrocitos de los bordes de la zona germinal son los que proliferan, y posteriormente se hipertrofian, y al final se calcificarán, y el hueso crece. Pero, si existe alguna causa que impide la proliferación de los condrocitos en la capa externa de la zona germinal, éstos se acumulan, y es el acúmulo de dichos condrocitos lo que avisa al hueso de que debe relanzar el crecimiento cuando cesa la causa que lo retardaba. Como postuló Willians, en 1975 (9), indudablemente existe una autorregulación del crecimiento a nivel de tejidos, pero ello no excluye, ni explica, el hecho de que, en un relanzamiento del crecimiento, el organismo reponga armónicamente todos los tejidos, porque para ello tiene que existir un control central global, que orqueste y organice el crecimiento.

TABLA 4

Circunstancias que entorpecen la posibilidad de recuperación del crecimiento provocado por malnutrición

- 1) Severo déficit proteico
- 2) Grado de enanismo
- 3) Excesivo largo periodo
- 4) Periodo de malnutrición más pronto, más daño
- 5) Animales que maduran tarde recuperan antes
- 6) Machos menos que hembras

Figura 2.- “Hipótesis neuroendocrina” de Tanner. Esquema sintetizado a partir de Nature 199: 845-850 1963. Curva patrón característica de cada especie. M1 y M2 desajustes por falta de inhibidor (ver texto)

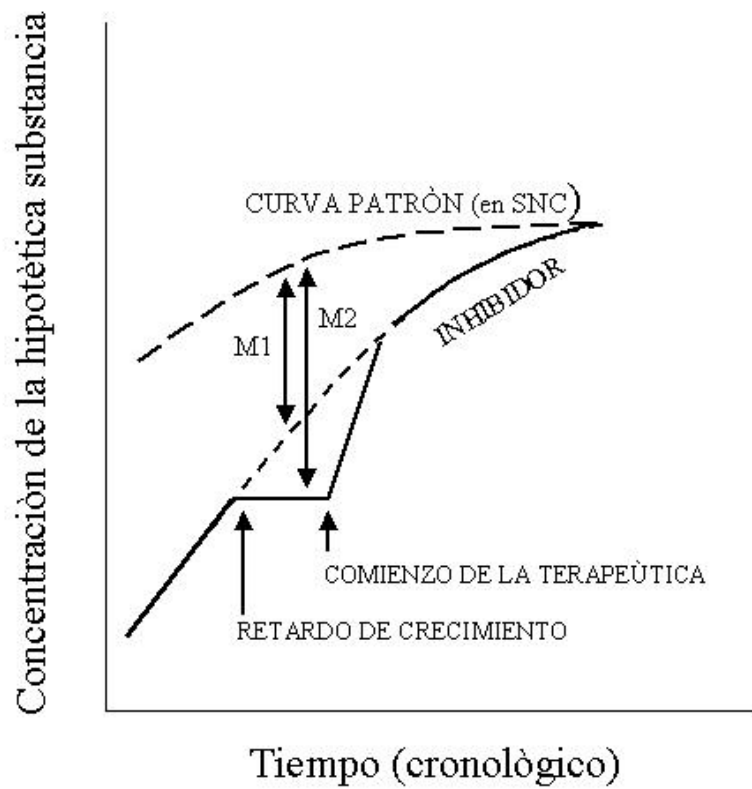


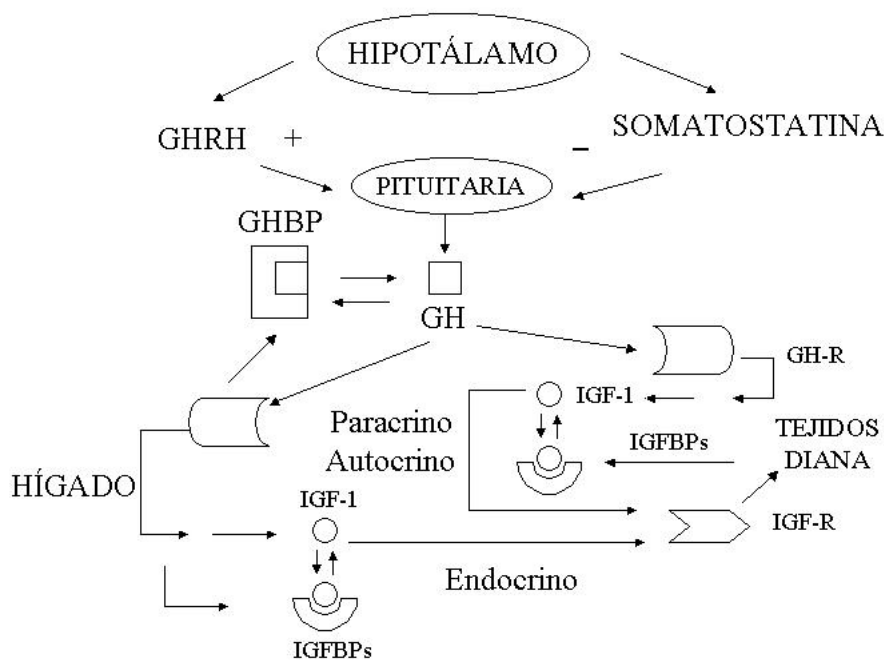
TABLA 5

Substancias orexigénicas	Substancias anorexigénicas
<ul style="list-style-type: none"> • Neuropeptido Y (NPY) • Galanina (GAL) • Péptidos opiáceos (β-endorfinas, dimorfina, POMC gene) • Melanina – concentrating hormone (MCH) • Glutamato y γ-aminobutírico (GABA) • Hipocretina (orexinas) 	<ul style="list-style-type: none"> • Leptina • CHR • Neurotensina (NT) • Similar a glucagón (GLP-1) • Melanocortina (α MSH, POMC gene) • Cart (cocaína y anfetaminas)

3.- AXIS SOMATOTROPO

Posteriormente a la hipótesis neuroendocrina postulada por Tanner (6), y quizá estimulado por ella, se estableció el llamado axis somatotropo, el cual aclara cómo se realiza el crecimiento de los huesos. La figura 3 muestra el hipotálamo estimulando en la hipófisis la GH por el factor hipotalámico (GHRH) estimulador de GH en la pituitaria e inhibiendo dicha hormona por el factor hipotalámico inhibidor, somatostatina, y cómo la hormona de crecimiento (GH) estimula a su vez, en hígado, los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs), y éstos son los que en último término están regulando el crecimiento del cartílago óseo. Además, los IGFs tienen siempre una correlación positiva, con coeficiente de correlación muy alto con el peso del cuerpo, y, por otra parte, los IGFs circulantes están absolutamente disminuidos en estado de subnutrición. Luego volvemos a encontrar la gran importancia del balance energético en el crecimiento, puesto que los IGFs, que disminuyen con la subnutrición, varían paralelamente al peso del cuerpo, y además son los efectores del crecimiento del cartílago óseo (4). Sin embargo todo ello no aporta gran conocimiento al posible control cerebral del crecimiento. Más recientemente (10), se han hecho aportaciones acerca del control cerebral del balance energético debido al estudio del control central del apetito.

Figura 3.- Axis GH/IGFs GH: Hormona de crecimiento. GHRH: Hormona hipotálamica que estimula secreción de GH (+). GHBP: Proteína transportadora en sangre de GH. IGF-I: Factor de crecimiento similar a la insulina. GH-R: Receptor de GH. IGFBPs: Proteínas transportadoras de IGFs.



4.- CONTROL CEREBRAL DEL APETITO

El primer escalón para el control del balance energético es el control del apetito. Los primeros experimentos que se realizaron trataban de localizar las zonas cerebrales relacionadas con el control del crecimiento. Trataban de ratificar la teoría neuroendocrina de Tanner. Se hicieron lesiones en animales, en el núcleo dorsomedial del hipotálamo, y también se irradió toda la cabeza, o se implantaron glucocorticoides en el núcleo dorsomedial de ratas. En todos los casos, se concluyó que estos animales

manipulados presentaban un crecimiento disminuido al 50% con respecto a la curva patrón de crecimiento de los animales no manipulados de su misma especie. Cuando dichos animales lesionados se malnutrían, detenían su crecimiento, y, si se sobrealimentaban, relanzaban dicho crecimiento, pero sólo hasta la curva patrón disminuída en un 50% con respecto a los animales normales. Luego la talla máxima a alcanzar por los animales lesionados, su "tamaño diana" correspondiente a su especie, estaba definitivamente disminuido por efecto de las lesiones con respecto a un animal normal. Con este tipo de experimentación se han detectado los lugares hipotalámicos directamente implicados en el control del apetito. Se han detectado núcleos hipotalámicos: el dorsomedial (DMN), el ventromedial (VMN), el supraquiásmico (SCN) y el núcleo arcuato (ARC); todos ellos implicados en el control del apetito. Son los lugares anatómicos desde donde se controla el apetito. Produciendo lesiones en el núcleo ventromedial, se produce hiperfagia y obesidad, por eso se le llamó "centro de la saciedad". Sin embargo, en el hipotálamo lateral (LH), situado en la zona dorsal y lateral al núcleo ventromedial, que se extiende desde el tegumento mesencefálico a la zona lateral del área preóptica, las lesiones producen falta de apetito, y se le llamó "centro del hambre". De todos los núcleos hipotalámicos mencionados, el núcleo arcuato es el que presenta células con caracteres más secretores, y es donde se secretan muchos péptidos. Los axones de las neuronas del núcleo arcuato llegan a los núcleos ventromediales o paraventriculares transportando las secreciones producidas en el núcleo arcuato (10). Estas secreciones son orexigénicas o anorexigénicas, provocan respectivamente apertura o cierre del apetito. Hoy sabemos que embebidas entre las redes neuronales hipotalámicas existen redes orexigénicas y anorexigénicas que controlan el apetito. La lista conocida de dichas sustancias está representada en la tabla 5. De todas las sustancias orexigénicas, la más conocida y la que tiene una acción más fisiológica es el neuropéptido Y (NPY). Es un péptido de 36 aminoácidos que se produce en el núcleo arcuato, también en el bulbo raquídeo y en el dorsomedial, pero fundamentalmente en el arcuato, siendo conducida posteriormente la secreción hasta el núcleo paraventricular. En lugares muy próximos dentro del núcleo arcuato se producen tanto las sustancias orexigénicas como las anorexigénicas como la α -melanocortina (α -MSH). Además, el núcleo arcuato está situado en la base del hipotálamo, y por tanto puede estar

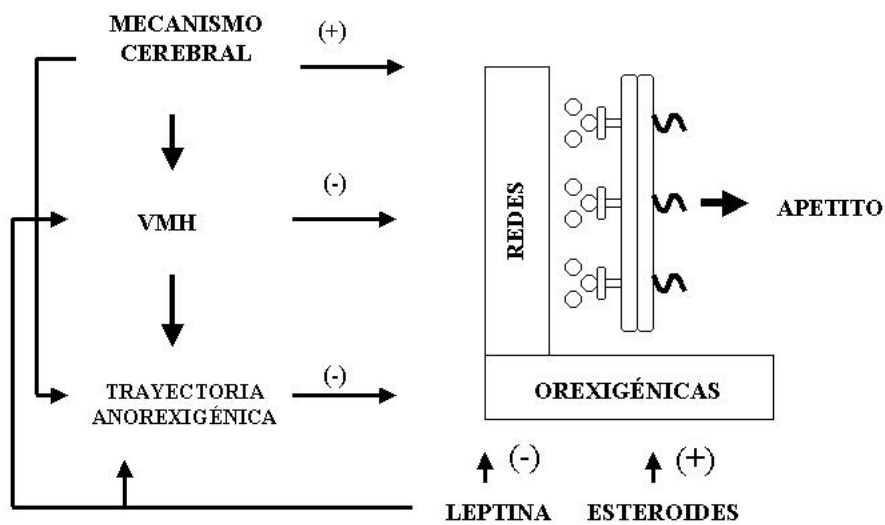
interconectado fácilmente con sustancias de la periferia a través del líquido cefalorraquídeo. El NPY se ha comprobado que actúa dosis-respuesta, y además es capaz de provocar la apertura del apetito en una rata, saciada, que acaba de comer. Actúa activando norepinefrina, o GABA (γ -aminobutírico) (11). En ratones transgénicos que no expresan NPY se ha podido estudiar que disminuye su peso en un 40%, pero dichos ratones siguen comiendo porque segregan galanina. Así que las sustancias orexigénicas se complementan y actúan sinérgicamente, por ello existe una lista tan amplia de ellas. Su gran número muestra, además, la importancia biológica que tiene el control del apetito. La relación entre las sustancias orexigénicas y anorexigénicas se ha estudiado fundamentalmente en roedores. Se ha analizado el hecho de que los roedores comen por la noche. Se sabe que la serotonina inhibe el NPY, y la serotonina disminuye por la noche, las neuronas que la producen están estimuladas por vía noradrenérgica; igual que sucede en la glándula pineal. Por ello por la noche disminuye la serotonina y aumenta el neuropéptido Y (NPY). En los roedores la apertura del apetito se produce según un complejo sistema de aumento de NPY, luego de galanina, y posteriormente de β -endorfina, y finalmente las tres sustancias orexigénicas desencadenan la sensación de hambre (12).

Entre las anorexigénicas la leptina es la más activa en su acción, pero no está secretada en el cerebro. La leptina es un péptido pequeño, está secretada en los adipocitos del tejido adiposo (13). Es el producto del gen "ob" de los adipocitos. En los obesos se descubrió, y se vió que tienen una gran cantidad de leptina, porque tienen mucho tejido adiposo, pero, sin embargo, en los obesos no actúa restringiendo el apetito porque presentan resistencia a la leptina. Se ha visto experimentalmente que la leptina inhibe la secreción del neuropéptido Y, y los animales dejan de comer. Tanto las sustancias orexigénicas como las anorexigénicas, producidas en el núcleo arcuato, actúan fijándose a receptores específicos sumamente extendidos en el cerebro, aunque no se conocen las rutas bioquímicas post-receptor. Estas sustancias son verdaderos traductores del apetito, envían señales que en los mamíferos superiores se integran en neuronas superiores, probablemente de la corteza cerebral, y ello decide la conducta de comer o no comer. Contrariamente a lo que sucede en roedores cuya conducta esta regida directamente por la falta de luz. Actualmente sabemos los lugares anatómicos hipotalámicos de control del apetito, conocemos las sustancias

anorexigénicas y orexigénicas que envían señales (Tabla 5), pero desconocemos la ruta bioquímica molecular post-receptor. También se sabe que la leptina ejerce su acción disminuyendo la secreción del neuropéptido Y (NPY) en el núcleo ventromedial fundamentalmente, pero no se sabe el mecanismo molecular. Así que el control neuronal del apetito (Fig.4) comprende dos grandes redes, orexigénicas y anorexigénicas, conectadas entre ellas de forma sutil, sus secreciones son originadas fundamentalmente en el núcleo arcuato. Este núcleo está además conectado con sustancias que vienen de la periferia, como la leptina del tejido adiposo, que restringe el apetito, o los esteroides adrenales o gonadales que aumentan el apetito. Todo este control del apetito, aún con las grandes lagunas de conocimiento que presenta en este momento, tiene mucha semejanza con la hipótesis neuroendocrina de Tanner. Los sitios anatómicos cerebrales a donde llegan las sustancias "inhibidoras" son los núcleos hipotalámicos reseñados anteriormente, la sustancia "inhibidora" periférica es fundamentalmente la leptina, o también los esteroides gonadales, aunque actúan abriendo el apetito, ya que ambos grupos de sustancias estarían reflejando el estado periférico propicio o no al crecimiento. De tal modo, que la leptina, que procede del tejido adiposo, se secreta más cuanto más adipocitos se poseen, reflejando la condición buena o mala, propicia o no, al crecimiento según el estado de la periferia.

Figura 4.- VMH: Núcleo ventromedial del hipotálamo. Según Kalra et al. E. Review (1999).

CIRCUITO NEURAL DE CONTROL DEL APETITO



4.1.- Insulina en cerebro

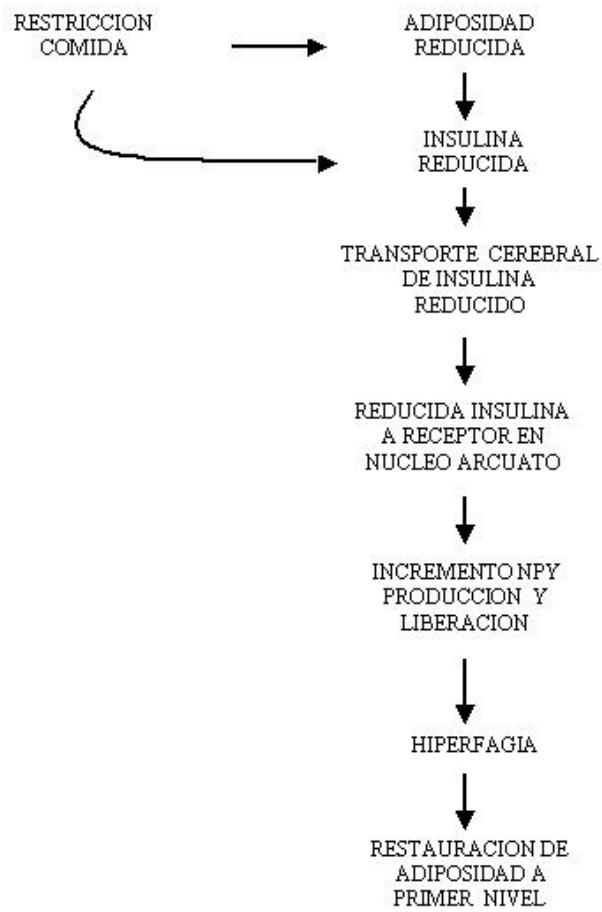
Si como hemos dicho el neuropéptido Y (NPY) es la sustancia orexigénica más fisiológica que abre el apetito, la siguiente pregunta es qué regula su secreción.

Durante años se ha investigado acerca de si el cerebro secretaba insulina. Hoy se cree que en el cerebro existe insulina (14). Por autorradiografía, inmunocitoquímica, o hibridación "in situ" con oligonucleidos se han encontrado receptores de insulina, fundamentalmente en hipocampo, núcleo arcuato, y bulbos olfativos. También se han encontrado los receptores de IGF-I, fundamentalmente, en hipocampo. Se cree, sin embargo, que la insulina no se secreta en el cerebro, sino que proviene de la insulina del páncreas, llegando al cerebro por vía líquido cefalorraquídeo, mientras que el IGF-I y el -II son secretados en cerebro. Se

ha visto que el aumento de la insulina circulante, y por consiguiente de la insulina cerebral, produce disminución del neuropéptido cerebral NPY, y por tanto, pérdida de apetito, mientras que la disminución de insulina provoca hipersecreción del NPY, y abre el apetito. La secreción del NPY regulado por la insulina se resume en la Tabla 6. La restricción de la comida produciría adiposidad reducida, y por adaptación al ayuno disminución de la insulina circulante, y por consiguiente disminución del transporte cerebral de insulina, y ello provoca reducción de la saturación del receptor cerebral de insulina en el núcleo arcuato, lo cual provoca entonces una hipersecreción en dicho núcleo de NPY con lo cual se produce hiperfagia en el animal que restaura la adiposidad y recomienza el ciclo. A su vez, la reducida adiposidad provoca disminución de leptina cuando la insulina disminuye, mientras que al aumentar la adiposidad aumentaría la leptina; absolutamente de forma inversa a la secreción de NPY. Además hay que considerar el hecho de que el balance energético se mantiene por un equilibrio entre la energía que producen los alimentos y la energía gastada, fundamentalmente, es un balance entre la ingesta y la termogénesis. La insulina cerebral parece, también, regular la termogénesis. Perros, en los cuales se denerva el páncreas, no producen el aumento de calor que se experimenta después de las comidas. Se cree que la insulina en cerebro está implicada en redes noradrenérgicas de los neurotransmisores cerebrales. Parece que la termogénesis se regula en los núcleos ventromedial y paraventricular, y los axones de dichos núcleos terminan en ganglios sinápticos. La insulina activaría la termogénesis vía NPY. El aumento de insulina inhibiría la secreción de NPY, y ello produciría un aumento de norepinefrina (NE) que activaría la termogénesis.

TABLA 6

Ciclo mediante el cual la insulina periférica disminuye y reduce su llegada al cerebro, estimulando en núcleo arcuato la secreción de neuropéptido Y (NPY). Según Schwartz M.W. et al. Endocrin. Review 13, n° 3 p.p. 387 (1992)



5.- POSIBLE PAPEL DE LA LEPTINA EN EL CRECIMIENTO

Hemos dicho que el crecimiento comprende dos vertientes: estatura y peso. Los datos clínicos, como se ha mencionado ya, dan cuenta de la gran relación entre ambas vertientes de crecimiento, puesto que niños retrasados solamente crecen después de haber aumentado su peso en un 80%. Además, la leptina aumenta paralelamente a los adipocitos, es decir, paralelamente a la masa de tejido adiposo, dicho de otro modo, según el peso del individuo. Pero para que la leptina pueda ser considerada la hipotética substancia periférica imaginada por Tanner; para que pueda ser considerada como el sensor del balance energético a nivel de cerebro, habrá que demostrar que también actúa en situaciones en que se crece sin necesidad de abrir el apetito, como es el caso del feto. Es decir, habrá que demostrar que la leptina está implicada en el crecimiento global al margen del control del hambre.

En etapas fetales, hay una gran proliferación celular y un incremento enorme del crecimiento, pero la alimentación se hace por el flujo placentario de la madre, el feto no tiene apetito. Además, a pesar de toda la gran cantidad de hormonas que regulan el crecimiento fetal (15,16,17), no está claro qué hormonas son decisivas en el aumento de crecimiento fetal, ni tampoco en el aumento de peso de la madre gestante, de una forma específica. En los últimos años se ha clonado el gen "ob" de los adipocitos, el que programa la producción de leptina. Se ha visto que existe una correlación positiva, con coeficiente de correlación muy alto, entre el peso del recién nacido y la leptina del feto. También se ha visto que dicha correlación es alta entre la leptina del feto y el peso de la placenta. Sin embargo, ni el peso al nacimiento ni el peso de la placenta se correlacionan positivamente con la leptina materna. La leptina materna está muy aumentada en la madre gestante, y se correlaciona positivamente con el peso de ella (18). Se ha visto que la placenta secreta mucha leptina, parece que es una hormona placentaria más (19). Así pues, comenzamos a ver que la leptina parece estar implicada en el crecimiento fetal cuando éste no es dependiente del apetito (19). En roedores, se ha mostrado (18,20) que el gen "ob" se expresa más en ratas que reciben insulina. En roedores, la leptina parece regulada por la insulina (21,22), sin embargo no sucede lo mismo en humano. En humano, deben existir otros metabolitos que regulan la leptina

(23). Un buen candidato podrían ser los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs). Éstos péptidos disminuyen con la subnutrición, están implicados en el crecimiento del cartílago, y son secretados en el cerebro. En circulación periférica no parecen aumentar cuando se relanza el crecimiento, pero sabemos muy poco de lo que ocurre en el cerebro. Recientemente, en un modelo de subnutrición que estudiamos en mi grupo, dentro de un proyecto de investigación de la Comunidad de Madrid, en el cual intentamos reproducir una situación de malnutrición en ratas, parecida a la anorexia nerviosa humana, y que es realizado en colaboración con el Dr. García Segura del Instituto Cajal del CSIC (24), hemos encontrado en dichos animales subnutridos aumentada la expresión del mRNA del receptor del IGF-I en cerebro. Son unos primeros datos que sugieren un posible papel de estos péptidos regulando el balance energético en el cerebro. Estos resultados parecen completar otros, existentes en la literatura científica, que muestran que el IGF-II implantado en el núcleo arcuato provoca una sensación de saciedad, más grande que la que produce la insulina.

6.- CONCLUSIONES FINALES.

Estamos pues, comenzando a entender el control cerebral del balance energético, el cual, a su vez, regula el crecimiento. Existen sin duda, en el momento actual, grandes lagunas de conocimiento. No conocemos las rutas moleculares que se producen en el cerebro post-receptor de sustancias orexigénicas y anorexigénicas. Tampoco sabemos donde se sitúan en el cerebro los centros superiores que integran las señales que vienen de los núcleos hipotalámicos y deciden la conducta de comer. Tampoco conocemos el sitio exacto, ni el mecanismo molecular por el cual la leptina o los esteroides adrenales o gonadales regulan la secreción del neuropéptido Y; aunque parece ser en el núcleo paraventricular. Así pues, estamos comenzando el conocimiento de cómo se controla el balance energético a nivel central, y ello nos llevará, sin duda, en el futuro a poder prevenir el retardo de crecimiento intrauterino que es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus en edad adulta. Por otra parte, estos conocimientos conducirán a poder controlar la obesidad patológica la cual es un factor de riesgo de muchas enfermedades, y muy difícil de combatir actualmente. Sin embargo, estos estudios permiten ya

poner de relieve el complicado equilibrio que rige el balance energético a nivel cerebral, y su importancia como rector del crecimiento. Todo ello destaca, sin duda, el papel fundamental de la nutrición en momentos de desarrollo, y debería ser una razón científica que llevara a la Sociedad actual a combatir el hambre en el Tercer Mundo como labor humanitaria prioritaria.

ABREVIATURAS

GHRH: Hormona hipotalámica estimuladora de la hormona de crecimiento.

GH	Hormona de crecimiento.
IGFs	Factores de crecimiento similares a la insulina.
DMN	Núcleo hipotalámico dorsomedial.
VMN	Núcleo hipotalámico ventromedial.
ARC	Núcleo arcuato hipotalámico.
LH	Núcleo hipotalámico lateral.
SCN	Núcleo hipotalámico supraquiásmico.
α -MSH	Melanocortina.
POMC	Proopiomelanocortina.
NPY	Neuropeptido Y.
GABA	γ -aminobutírico.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las instituciones: Comunidad de Madrid (CAM), Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT), Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) que ininterrumpidamente desde 1970 han subvencionado nuestro trabajo. También quiero destacar el estímulo que han representado para mí, todos estos años, las colaboraciones con los miembros de mi grupo de trabajo cuyos nombres aparecen en la bibliografía.

BIBLIOGRAFIA.

- (1) PASCUAL-LEONE A.M., GOYA L., ALÁEZ C., RIVERO F., ESCRIVÁ F., ALVAREZ C., MARTÍN M.A. (1994) Regulation of endocrine factors by nutrients during the fetal period in mammals. *Current Trends in Exp. Endocrinol* 2, 105.
- (2) RIVERO F., GOYA L., ALÁEZ C., PASCUAL-LEONE A.M. (1995) Effects of undernutrition and diabetes on serum and liver mRNA expression of IGFs and their binding proteins during rat development. *Journal of Endocrinology* 145, 427-440.
- (3) GOYA L., RIVERO F., MARTÍN M.A., ARAHUETES R., HERNÁNDEZ E.R., PASCUAL-LEONE A.M. (1996) Effects of refeeding of undernourished and insulin treatment of diabetic neonatal rats on IGF and IGFBP. *Am. Physiol.* 271 (Endocrinol.Metabol 34) E223-231.
- (4) BOERSMA B., MAARTEN WIT J. (1997) Catch-up Growth. *Endocrine Reviews* 18(5), 646-661.
- (5) WILSON P.N., OSBOURN D.F. (1960) Compensatory growth after undernutrition in mammals and birds. *Biol Rev* 35:324-363.
- (6) TANNER J.M. (1963) Regulation of growth in the size in mammals. *Nature*, 199:845-850.
- (7) WEISS P., KAVANAU J.L. (1957) A model of growth and growth control in mathematical terms. *J. Gen Physiol* 41, 1-47.
- (8) BARON J., KLEIN K.O., COLLI M.J., YANOVSKI J.A., NOVOSAD J.A., BACHER J.D., CUTLER G.B.JR. (1994) Catch-up growth after glucocorticoid excess: a mechanism intrinsic to the growth plate. *Endocrinology* 135, 1367-1371.
- (9) WILLIAMS J.P.G., HUGHES P.C.R. (1975) Catch-up growth in rats undernourished for different periods during the suckling period. *Growth* 39, 179-193.
- (10) KALRA S.P., DUBE M.G., PU S., XU B., HORVATH T.L., KALRA P.S. (1999) Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews* 20(1): 68-100.
- (11) KALRA S.P., KALRA P.S. (1996) Is neuropeptide Y a naturally occurring appetite transducer?. *Curr Opin Endocrinol Diab* 3:157-163.

- (12) XU B., KALRA P.S., KALRA S.P. (1996) Food restriction abolishes the daily rhythm in gene expression of hypothalamic neuropeptide Y (NPY), galanin (GAL) and β -endorphin (POMC) and adipocyte leptin but not in leptin secretions. Program of the 80th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans (Abstract P3-246), p 437.
- (13) BRADFORD S.H., PAGLIA D., KWAN A.Y.M., DEITEL M. (1995) Increased *obese* mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nature Medicine* 1(9) 953.
- (14) SCHWARTZ M.W., FIGLEWICZ D.P., BASKIN D.G., WOODS S.C., PORTE D. JR. (1992) Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocrine Reviews*, 13(3) n°3 387.
- (15) PASCUAL-LEONE A.M. (1986) Hormonas placentarias. Factores endocrinos en el desarrollo prenatal y neonatal.p.251 In: "Bioquímica Perinatal". Fundación Ramón Areces.Editor: Emilio Herrera.
- (16) PASCUAL-LEONE A.M. (1988) Hormonas placentarias. p.109. In: "Bioquímica perinatal" (aspectos básicos y patológicos). Fundación Ramón Areces. Editor: Emilio Herrera.
- (17) PASCUAL-LEONE A.M. (1988) Características endocrinas fetales. Anormalidades congénitas. In: "Bioquímica perinatal (aspectos básicos y patológicos)". Fundación Ramón Areces. Editor: Emilio Herrera.
- (18) HASSINK S., DE LANCEY E., SHESLOW D., SMITH-KIRWIN S., O'CONNOR D., CONSIDINE R., OPENTANOVA I., DOSTAL K., FUNANAGE V. (1997) Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal developmen?. *Pediatrics* 100(1):1-6.
- (19) LEPERCQ J., CAUZAC M., LAHLOU N., TIMSIT J., GIRARD J., AUWERX J., HAUGUEL-DE MOUZON S. (1998) Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy. *Diabetes* 47:847-850.
- (20) SCHUBRING C., KIESS W., ENGLARO P., RASCHER W., DOTSCH J., HANITSCH S., ATTANASIO A., BLUM W.F. (1997) Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J.Clin.Endocrinol.and Metab.* 82(1):1480-1483.

- (21) SALADIN R., DEVOS P., GUERRE-MILLO M., LETURQUE A., GIRAD J., STAELS B., AUWERX J. (1995) Acute and chronic effect of insulin on leptin production in humans. *Nature* 377, 52.
- (22) SIVAN E., LIN W.M., HOMKO C.J., REECE E.A., BODEN G. (1997) Leptin is present in human cord blood. *Diabetes* 46:917-919.
- (23) KOLCZYNSKI J., NYCE M., CONSIDINE R., BODEN G., NOLAN J., HENRY R., MUDALIAR S., OLEFSKY J., CARO J. (1996) Acute and chronic effect of insulin of leptin production in humans. Studies in vivo and in vitro. *Diabetes* 45:699-701.
- (24) SHOWEN J.A., RAMOS S., GOYA L., MARTÍN M.A., GARCÍA-SEGURA L.M., PASCUAL-LEONE A.M. Alterations of brain IGF/IGFBPs system in undernourished neonatal rats. (En prensa) *Journal of Endocrinology*.

Más evaluaciones para los medicamentos: las económicas^{*}

FERNANDO ANTOÑANZAS VILLAS

*Departamento de Economía y Empresa.- Edificio Quintiliano.-
Universidad de la Rioja.- 26004 Logroño*

RESUMEN

Los avances en la investigación relacionada con los medicamentos han ido acompañados de evaluaciones de diversa índole que intentaban garantizar la seguridad, la eficacia y la efectividad de los medicamentos. Esa tarea de evaluación respondía a las preocupaciones sociales de cada momento. Actualmente, con un marco legal que regula los precios de los nuevos productos en numerosos países y que financia públicamente el consumo, han surgido nuevas cuestiones que no pueden contestarse mediante las evaluaciones tradicionales. La evaluación económica encaminada a medir la eficacia de las diferentes opciones terapéuticas surge como una vía de avance para resolver tales preguntas. Sin embargo, en el estudio empírico presentado en este artículo se resaltan las barreras que los profesionales sanitarios han detectado para la generalización del empleo de esa clase de evaluación. Finalmente, se proponen algunas recomendaciones que facilitarían el empleo de este nuevo instrumento informativo de ciertas características de los fármacos.

Palabras clave: Evaluación económica.- Eficacia.- Efectividad.- Eficiencia.

SUMMARY

* Una versión similar ha sido incluida en: "Domínguez Gil-Hurlé, A. Farmacoeconomía. F. Antoñanzas, Cap. 4: Evaluación económica de medicamentos, págs. 89-110. Instituto de Estudios Médico-Científicos. Madrid 2001". Conferencia pronunciada en la Real Academia de Farmacia el día 22 de junio de 2000.

More evaluations for pharmaceuticals: The economic ones

The new developments of the research applied to pharmaceuticals have come together with different types of assessments that intended to guarantee the security, efficacy and effectiveness of drugs. This task of assessment answered the social concerns of each period. Nowadays, under the frame of regulations on the prices of new products in many countries and after the introduction of public reimbursement, many questions have raised; however, the traditional assessments cannot answer them. Economic evaluation is focused to measure the efficiency of the different therapeutical options and appears as a way of progress to answer these questions. Nevertheless, the empirical study shown in this article outpoints the barriers that health professionals have detected before the generalization of this type of assessment. Finally, some recommendations that would ease the utilization of this new informative instrument of some characteristics of pharmaceuticals are presented.

Key words: Economic evaluation.- Efficacy.- Effectiveness.- Efficiency.

INTRODUCCIÓN

En diferentes áreas de la administración pública se han aplicado las técnicas de la evaluación económica para medir la eficiencia de las diferentes opciones. El ámbito de los proyectos de obras públicas han sido uno de los que más tradición ha tenido en su empleo. Los estudios de Sudgen y Williams (1), Drummond (2) y Weinstein (3) adaptaron los métodos de la evaluación económica, existentes desde la década de los cincuenta, al ámbito sanitario y sus trabajos han sido frecuentemente citados. En España, fue pionera la obra de Artells (4), y, posteriormente, el libro coordinado por Sacristán, Badía y Rovira (5) constituye también una buena referencia para iniciarse en estas materias. En la década de los noventa, se han publicado varias guías, en diferentes países, con el ánimo de estandarizar y homologar los criterios de aplicación práctica de los métodos a fin de reforzar la credibilidad de los resultados; la razón es que se había detectado un amplio margen de maniobra en la elaboración de los estudios, de forma que dos analistas distintos podían llegar a resultados bien diferentes. En España, se ha redactado un conjunto de recomendaciones –Rovira y Antoñanzas (6)- acerca de cómo aplicar los métodos de evaluación económica, aunque no tiene el carácter de oficial.

Dentro de las tecnologías sanitarias, los medicamentos ocupan un lugar especial por la gran cantidad de datos existentes, en términos

comparativos, acerca de la eficacia (ensayos clínicos), efectividad y efectos adversos (series de farmacovigilancia), y consumo de recursos (facturación y prescripciones). Además, y desde fechas recientes, nuevas inquietudes se han centrado en estos productos: el interés por conocer si su empleo es eficiente o rentable en términos sociales, habida cuenta de la considerable repercusión en el gasto público; el fomento de las políticas de prescripción más acordes con los objetivos de la sanidad pública; y los propios intereses de la industria farmacéutica en averiguar si dispone de ventajas competitivas porque sus productos son más eficientes que sus competidores cercanos, para, de este modo, modificar sus políticas de investigación, y de comercialización, entre otras.

La finalidad de este texto radica en estudiar si la evaluación económica constituye un eslabón más en la cadena de investigaciones relacionadas con los fármacos –describiendo el contexto actual-, y en averiguar si el cambio que se está experimentando en otros países, que ya han comenzado a introducir esta nueva forma de evaluación, está siendo incorporado por los agentes sanitarios en sus procesos de adopción de decisiones. Por último se incluyen una serie de recomendaciones que pueden entenderse como una agenda de trabajo para facilitar el empleo de estas técnicas en el sistema nacional de salud.

EVALUACIÓN ECONÓMICA: UN REPASO DE SUS COMPONENTES Y APLICACIONES

Según la reciente revisión de los estudios de evaluación económica llevados a cabo en España (7), durante las dos últimas décadas se publicaron 87 artículos, de los cuales 57 (un 65%) se referían a tecnologías sanitarias materializadas en medicamentos. En el contexto internacional, una amplia revisión de Pritchard (8) a partir de unos catorce mil artículos extraídos de varios bancos de datos, mostraba que, entre 1992 y 1996, la proporción de evaluaciones económicas referidas a medicamentos respecto del total de evaluaciones económicas de tecnologías sanitarias pasaba del 54% al 46%. Proporciones elevadas aunque algo menores que las registradas en España.

En la descripción de los métodos de evaluación económica aplicados al ámbito sanitario se ha tenido a clasificar los tipos de análisis

dependiendo de la medición de los efectos sobre la salud, ya que los costes derivados de la utilización de recursos sanitarios se calculan siempre en unidades monetarias. Así, la evaluación económica ha adoptado cuatro formas, que son: el análisis de minimización de costes que no mide los efectos sobre la salud a suponer que son idénticos en todas las opciones objeto de estudio; el análisis coste/efectividad que mide los efectos sobre la salud en términos de unidades físicas sencillas (años de vida ganados, muertes evitadas, casos de una cierta enfermedad evitados, efectos adversos evitados, etc.) estableciendo la relación por cociente con los costes de los recursos empleados; el análisis coste/utilidad que constituye una sofisticación del análisis coste/efectividad al medir los componentes de la calidad de vida asociados a los efectos físicos de vida ganado ajustado por calidad; y el análisis coste/beneficio que valora también en unidades monetarias los efectos sobre la salud. Estas formas de evaluación económica son las más tradicionales; actualmente se suelen emplear varios indicadores para abordar desde diferentes perspectivas los resultados sobre la salud. También se pueden introducir otros criterios que califiquen los tipos de análisis dependiendo de diversas características como, por ejemplo, de la disponibilidad de datos de efectividad a partir de un estudio de cohortes o demográfico o de la aplicación de la tecnología sanitaria en un contexto particular o bien en otro más general, etc. En definitiva, los tipos de análisis no constituyen un asunto cerrado sino que admiten varias clasificaciones.

La evaluación económica conjuga o reúne un conjunto de datos referidos a las tecnologías sanitarias –medicamentos, por ejemplo-, elabora un modelo o patrón de las relaciones entre los efectos sobre la salud y los recursos sanitarios y no sanitarios, y concluye con un resultado en términos de los costes por efecto sanitario logrado. Esta síntesis de información sólo es viable de acometer con garantías de calidad cuando se posee información suficiente de los diferentes elementos que la integran. Así pues, sólo cuando al menos se ha dispuesto de datos de la eficacia de los medicamentos, cosa que no fue posible obtener con precisión hasta la década de los sesenta cuando se estandarizó y reguló la realización de ensayos clínicos, y, mejor aún, de su efectividad -de su empleo en el mundo real y no en los ensayos clínicos donde hay más

variables controlables- es posible acometer un estudio de evaluación. Esto es, existe una secuencia que no puede alterarse: primero, hay que conocer los datos de eficacia, posteriormente, de efectividad y, finalmente, podrá calcularse la eficacia. De la calidad de las mediciones anteriores dependerá la del estudio de eficiencia. En caso de carecer de algún dato, es preciso introducir supuestos de trabajo lo cual irá en detrimento de la precisión de los resultados finales. Además, habría que añadir que para que tales estudios de evaluación puedan efectuarse con un mínimo de facilidad, es preciso disponer de información contable relativa a los costes de las diferentes intervenciones sanitarias. Los métodos de obtención de esta última clase de información no están suficientemente regulados en numerosos países europeos y constituyen una de las barreras técnicas para el empleo generalizado de los instrumentos de evaluación económica.

A partir de estos elementos es posible intentar la elaboración de un estudio de evaluación económica. No obstante intentar la elaboración de un estudio de evaluación económica. No obstante, como antes se mencionaba, es preciso relacionar las variables sanitarias y económicas entre sí, y ello suele necesitar la formulación de un modelo. Al igual que los ensayos clínicos, que también emplean los modelos –por ejemplo, las pruebas estadísticas son una clase de modelos-, la evaluación económica precisa introducir diferentes supuestos sobre variables determinantes de la eficiencia como son: los costes futuros de los tratamientos, el número de personas libres de ciertas enfermedades durante un periodo determinado, el curso natural de la enfermedad en un grupo de pacientes, la reducción de la incidencia y prevalencia futuras de alguna infección tras aplicar un programa preventivo, etc. todos estos supuestos se pueden plasmar en cifras concretas de efectividad y de sus repercusiones en la utilización de recursos sanitarios mediante el empleo de modelos que relacionen diversas variables y parámetros con funciones matemáticas. De esta suerte, en la última década, numerosas evaluaciones económicas han utilizado los modelos basados en árboles de decisión, los modelos de Markow, y otros de ecuaciones diferenciales que facilitan la obtención de resultados. Además, desde la perspectiva de la adopción de decisiones, el uso de los modelos facilita la configuración de distintos escenarios en torno a la variable objetivo o clave para la evaluación en función de los valores de las variables intermedias o independientes y de los parámetros

que pudieran estar medidos con menor precisión. Estos modelos pueden dificultar la lectura del estudio de evaluación e incluso restarle credibilidad –por no conocer los instrumentos empleados o por la posibilidad de que se hubiera introducido sesgos intencionados en los resultados finales-, pero son imprescindibles en muchas situaciones para poder concluir un resultado coherente con los objetivos perseguidos por el propio proceso de la evaluación.

LA PREOCUPACIÓN POR LA SEGURIDAD, POR LA EFICACIA, Y POR LA EFECTIVIDAD

Ahora bien, todo este esfuerzo de evaluación económica aplicado a los medicamentos ha de, a su vez, evaluarse para ver si compensa o no. Si se examina la historia más reciente de otras evaluaciones aplicadas a los fármacos, podemos observar que no ha sido hasta la segunda mitad de este siglo cuando se han impuesto los controles más rigurosos a los estudios de seguridad. Este requisito fue el primero en establecerse, antes incluso que el de eficacia; en este sentido, hasta 1977, en España, no se exigía para la comercialización de un nuevo fármaco la condición de haberse probado su eficacia, sino sólo su seguridad. Esta característica de la seguridad se estudia en las fases preliminares del desarrollo del producto, antes de administrarlo a los seres humanos –y posteriormente también mediante los registros de reacciones adversas y los procesos de farmacovigilancia.

Durante la década de los años sesenta se establecieron las normas que habían de seguir los estudios de eficacia –y también de seguridad, por extensión- realizados a través de los ensayos clínicos (la declaración de Helsinki de 1964 establecía los derechos de los pacientes en tales ensayos, y, posteriormente, las normativas de cada país establecían la aplicación metodológica concreta en el contexto jurídico y sanitario de cada sistema- por ejemplo, en España es el R.D. 561/1993 del 16 de abril el que regula la realización de dichos ensayos clínicos) (9).

A pesar de la evolución paulatina en su metodología, del aprendizaje de las técnicas de su realización, de la experiencia que da el tiempo transcurrido desde los primeros ensayos, y aún considerando que dichos ensayos constituyen la mejor forma de medir la revisión (11) de 59

fármacos clínicos llevados a cabo durante 5 años, en España –publicados en tres revistas de especial relevancia- se detectó que aproximadamente la tercera parte contenía fallos metodológicos importantes como para invalidar los resultados alcanzados. También relacionado con la idea anterior, el equipo de Carré (12) se centró en la evaluación de los métodos estadísticos empleados en los ensayos clínicos con medicamentos, en centros españoles, desde 1970; de los 288 artículos estudiados, sólo en el 40% de los casos los resultados se presentaron de forma clara y comprensible, y sólo el 22,2% de los artículos emplearon los intervalos de confianza para describir los resultados. La tarea de revisión concluía señalando que todavía queda un largo camino por recorrer a fin de mejorar la aplicación de tales métodos estadísticos y, en definitiva, de mejorar la calidad de los resultados de los ensayos clínicos.

Desde la década de los noventa, ha surgido una preocupación en los sistemas sanitarios por asegurar la efectividad de los tratamientos; esto es, de garantizar que aunque las condiciones de aplicación de un fármacos difieran de las modélicas del ensayo clínico los resultados sobre la salud de los pacientes son acordes con los esperados. La corriente del control de calidad de la asistencia sanitaria junto con el desarrollo de nuevas tecnologías que habían mostrado su eficacia en pequeños grupos, llevó a que los profesionales sanitarios intentaran garantizar que el empleo de esas tecnologías en sus pacientes era adecuado y conseguía los fines deseados. Un requisito era imprescindible para que tal preocupación pudiese ser canalizada debidamente: la información –que no los meros datos-. En este orden de ideas, los sistemas informáticos estadísticos pudiesen actuar y extraer las conclusiones de los diferentes estudios llevados a cabo en diferentes centros sanitarios del orbe. De esta forma, el meta-análisis ha surgido como una técnica nueva de análisis de la información disponible, y está siendo ampliamente empleado –una revisión de este método puede estudiarse en Stewart (13)- . No obstante, Sacristán, Soto y Galende (14) ha resaltado los posibles sesos –se tienden a publicar más los resultados que suponen un éxito terapéutico que aquellos de carácter más neutral- que esa forma de proceder puede introducir; además, cabe mencionar que todavía estos métodos de recopilación de información y de la llamada búsqueda de la “evidencia” – mejor traducirla por las pruebas- están en una fase inicial de su desarrollo.

A pesar de los comentarios críticos, cualquiera que examine retrospectivamente los pasos dados en la dirección de medir mejor –más científicamente- la seguridad, la eficacia, y el conocimiento de las repercusiones a gran escala derivadas del empleo de los medicamentos –a las cuales podríamos llamar los estudios de efectividad basados en ensayos clínicos de corte “naturalista”, en series de farmacovigilancia o en las revisiones mediante meta-análisis- dirá que los avances son considerables y el camino trazado ha sido fundamental para mejorar la práctica médica basada en el uso de los fármacos. Quizás la respuesta esté tan clara porque cualquiera de las tres preocupaciones a las que responden las tres clases de estudios –de seguridad, de eficacia y de efectividad- se encuentra dentro del mismo campo semántico: el medicamento como sustancia para tratar o prevenir la enfermedad de los seres humanos.

LA PREOCUPACIÓN POR LA EFICIENCIA

Las instituciones sociales (la administración pública, los gestores sanitarios y clínicos, la industria farmacéutica, las asociaciones de usuarios de la sanidad, etc.) han ido introduciendo elementos nuevos para el debate y el estudio relacionados con los medicamentos, pero no tanto en el sentido anterior sino en el de su faceta social, industrial, económica, política, etc. Entonces, los criterios de evaluación que habían consolidado los avances científicos han tenido que ampliarse para dar respuesta –o al menos para intentarlo- a las nuevas cuestiones. A fin de concretarlas se proponen algunas de las más relevantes.

La fijación del precio

Establecer el precio de los fármacos es un asunto que puede abordarse de dos formas: desde la administración pública y desde el mercado. Si se opta por la segunda, en ausencia de la regulación pública, al existir un derecho de patentes internacionalmente reconocido para tales productos, el laboratorio fabricante puede actuar como un monopolista y fijar el precio atendiendo, esencialmente, a sus propios intereses. En varios países europeos se adoptan las decisiones de esta manera: Alemania, Dinamarca y Finlandia, entre otros. En este caso, el control del

gasto sanitario se suele abordar mediante controles de prescripción o haciendo uso del poder de monopsonio o de único comprador que tiene la Administración Pública para decidir hasta qué precio o qué clases de indicaciones se financian públicamente.

Sin embargo, en la mayoría de los países existe una intervención que actúa en la fase de fijación del precio de los medicamentos. A esta intervención se la denomina, en Economía, regulación del monopolio. Con esta actividad se pretende que el precio del fármaco sea más bajo que el que existiría en ausencia de regulación. Este menor precio tiene por objetivo, en un sentido amplio, facilitar el acceso de la población a los medicamentos –facilitar un mayor consumo a menores precios-, a la vez que reducir el importe de la factura pagada por la administración pública al financiar el reembolso de dichos productos.

No hay una forma única, comúnmente aceptada en los países europeos, para establecer la cifra del precio; de hecho, la directiva de la transparencia señala que los estados miembros son quienes tienen esa capacidad, pero han de practicarla de forma transparente mostrando claramente los criterios utilizados. Generalmente, se consideran uno o varios criterios: la comparación con los costes de similares productos (Francia); los precios del mismo producto en otros países (Portugal, Austria, Italia); el control de beneficios de los laboratorios (Reino Unido); la evaluación económica como refuerzo o complemento de otros criterios (Reino Unido, Holanda, Portugal, Noruega, Suecia); costes de producción y otros costes y criterios (España).

El criterio de la evaluación económica añade una nueva información que forma parte de los elementos examinados por las administraciones públicas encargadas de establecer el precio. Los estudios de evaluación económica comparan la efectividad –o eficacia, en ausencia de datos derivados de las condiciones de uso del fármaco en la práctica real- de un medicamento respecto a la conseguida por otro u otros alternativos, y miden los costes derivados de ambas opciones sanitarias. Si el precio de un medicamento es muy elevado en comparación con la opción alternativa, siendo los efectos sobre la salud similares, la evaluación económica calificará como menos eficiente al fármaco más caro.

Con viene a este respecto recordar que cuando se establece el precio de un nuevo medicamento, por parte de la Administración Pública, no se dispone de una experiencia larga acerca de los resultados sobre la salud en situaciones del mundo real, sino más bien de las ideales de un ensayo clínico. Este condicionante lleva a que la evaluación adopte la forma de coste/eficacia y se aleje del objetivo de mayor interés para los agentes sanitarios. En este sentido sería interesante que las decisiones de fijación de precios no tuviesen el carácter de permanentes sino de temporales y pudiesen revisarse al disponer de nuevos datos.

Sin embargo, la evaluación económica no fija el precio exacto que ha de tener el nuevo producto sino que indica a partir de qué valor deja de ser rentable o eficiente para la sociedad su empleo en comparación con la otra u otras opciones existentes. Aunque la evaluación económica no facilite el valor exacto que habría de tener el precio, sí que es un elemento interesante para tener en cuenta, ya que averigua el umbral o valor máximo en el contexto sanitario considerado. En este orden de ideas, la Ley del Medicamento de 1990 (15), ya cita la eficiencia entre los elementos que han de valorarse en este proceso. El Real Decreto 271/1990 de 23 de febrero referido al procedimiento de fijación de los precios de los medicamento establece que los precios han de atender al coste completo y al criterio de la congruencia –referido a la utilidad terapéutica y a la proporcionalidad (estudiar los costes de otros medicamentos similares). Esto es, ya se dispone de un marco legal que aunque no totalmente sí que deja la puerta entreabierta para que en este complejo proceso de establecimiento del precio se puedan incluir los resultados de la evaluación económica. Nótese que el criterio de la congruencia implícitamente está impulsando un ejercicio de evaluación económica al considerar que de los fármacos ya existentes de efectos similares, se examinen sus costes –en definitiva, se indica que ha de efectuarse al menos un ejercicio de evaluación económica de la clase análisis de minimización de coste, como antes se ha descrito-.

La financiación pública o reembolso de los medicamentos

Esta decisión está muy relacionada con la fijación de precios (en los países donde están regulados). La regulación acerca de si un producto

ha de pagarse con cargo a los fondos públicos es otra de las cuestiones que más afectan a la accesibilidad a un fármaco por parte de la población. La existencia de un ticket moderador, copago o participación del usuario lleva a que la administración pública sea copartícipe junto con el paciente en la adquisición de unos productos pensados para mejorar su estado de salud. En casi todos los países europeos la administración pública tiende a soportar la mayor parte del coste del medicamento. En España, por ejemplo, cuando se miden de forma agregada las participaciones en la adquisición de los fármacos, los pacientes contribuyen con menos del 8% del importe total de los fármacos prescritos mediante receta. La razón de tan baja radica en que existen numerosas excepciones al principio general de una participación del 40% del valor por parte de los pacientes: exención total para los pensionistas, para ciertas enfermedades crónicas, etc. Esta política sanitaria y social de financiación pública es de suma importancia ya que colabora para facilitar el acceso de la población a los medicamentos.

De nuevo, el establecimiento de la financiación pública para un fármaco ha de tener en cuenta varios factores como pueden ser: la utilidad terapéutica, los estados de salud de los pacientes, la calidad del producto, su precio, etc. Además, si la administración pública busca extraer la máxima rentabilidad social a los presupuestos, habrá de considerar en esa compleja decisión los fármacos existentes y relacionados con el nuevo producto. Esto es, habrá de efectuar una evaluación económica más o menos explícita. En España, la Ley del Medicamento en su artículo 94, al tratar de la financiación pública (1.d, 1.e y 2.3) deja el texto redactado de manera que tiene cabida la evaluación económica para adoptar tales decisiones. En otros países, como en Australia desde 1992, la evaluación económica de los nuevos medicamentos es una condición indispensable para que se inicie el proceso encaminado a su posible financiación pública. En la provincia canadiense de Ontario, también se emplea este criterio como un elemento esencial, desde fechas similares.

Los precios de referencia

Como una modalidad del reembolso público de los medicamentos ha surgido en la década de los noventa este nuevo instrumento. Mediante

los precios de referencia, la administración pública fija una cuantía por encima de la cual deja de cofinanciar, junto con el usuario, el consumo de medicamentos sujetos a prescripción. Esta medida intenta reducir la factura farmacéutica pública basándose en el criterio de que existen otros productos de similar efectividad a un coste menor (que es el que se decide financiar con cargo a los fondos públicos). Es decir, el establecimiento de los precios de referencia lleva implícito el concepto de evaluación económica –ya que, al menos teóricamente, no sólo se ha de basar el precio de referencia en el coste de la dosis diaria sino en otros costes relacionados con el proceso de enfermedad y las intervenciones sanitarias necesarias para su curación-. En España, el Real Decreto 1035/1999, de 18 de junio (BOE de 30 de junio) por el que se regula el sistema de precios de referencia propone una forma de cálculo que parte de un conjunto homogéneo de productos en los que se valora según una fórmula el nuevo precio hasta el que se tendrá derecho al reembolso o la financiación pública. En este caso, como se ha regulado que los medicamentos incluidos en los grupos homogéneos han de contener los mismos principios activos y ser de idénticas dosis y presentación, el estudio de la eficiencia ha de examinar únicamente el coste del producto y adopta, en consecuencia la forma de un análisis de minimización. Los precios de referencia están vigentes en varios países europeos: Alemania (el primero en su introducción –1989-), Holanda, Dinamarca, Polonia, Eslovenia e Italia. También existen precios de referencia en EE UU, Nueva Zelanda, Australia y en la región canadiense de British Columbia.

En otros ámbitos de la adopción de decisiones relacionadas con la prescripción de fármacos –los formularios o listas de medicamentos de uso hospitalario, y las circulares o recomendaciones de medicamentos para la atención primaria-, los criterios de evaluación económica están también implícitos. Se examina el valor terapéutico del medicamento en relación con otras opciones y se calcula su propio coste y el de las opciones –generalmente en términos de dosis diaria definida-. Este análisis se lleva a cabo, generalmente en términos de dosis diaria definida-. Este análisis se lleva a cabo, generalmente, de una forma sencilla y sin desarrollar un modelo que integre todos los elementos. Pero la idea subyacente es la de evaluar en términos económicos las opciones terapéuticas y recomendar el uso de la que sea más eficiente. No obstante,

este criterio general admite otras consideraciones y matices que completan el proceso de adopción de las decisiones.

Los propios laboratorios farmacéuticos son una parte integrante de los procesos de fijación del precio del producto y de la negociación referida a la financiación pública de los medicamentos. En su calidad de participantes en esos procesos pueden apoyarse en los resultados de la evaluación económica y mostrar la posición relativa de sus productos en el contexto farmacéutico. Además de esta posibilidad, los laboratorios pueden emplear el criterio de la evaluación económica como un instrumento adicional para establecer sus políticas de I+D (orientando la investigación hacia áreas terapéuticas donde los márgenes de eficiencia son más elevados; por ejemplo, al haber unos pocos productos con altos costes por efecto). También para las políticas de comercialización de sus productos (al ofrecer una información adicional a los potenciales clientes), e incluso para otras decisiones relacionadas con la vinculación a otras empresas del sector mediante alianzas, licencias, fusiones, adquisiciones, etc., al disponer de mediciones de la eficiencia de los productos de otras compañías que pueden complementar con esa cualidad la oferta de los propios.

LA OPINIÓN DE LOS AGENTES DEL SISTEMA SANITARIO POR LA EFICIENCIA

La introducción de un criterio adicional para la adopción de decisiones en torno a los medicamentos requiere un conjunto de condiciones para que pueda ser empleado por parte de los agentes involucrados. Podría decirse que la introducción del criterio de la evaluación económica representa un cambio cultural, -al traspasar el contexto semántico anteriormente señalado- similar al que en su día se adoptó con el empleo de los ensayos clínicos, y al de la nueva corriente en la medicina basada en la evidencia. No obstante, al haber más participantes en el contexto de las decisiones sociales relacionadas con los medicamentos, el alcance de la forma de trabajo planteada por la evaluación económica es incluso mayor.

En este orden de ideas, se ha intentado analizar si la medición de la eficiencia preocupa a los diferentes agentes sanitarios, si ven en este instrumento una ayuda para la adopción de sus decisiones y, en caso

contrario, averiguar cuales serían las barreras e incentivos que sería necesario remover e introducir, respectivamente, para potenciar el empleo del nuevo criterio. Varios investigadores europeos han llevado a cabo la tarea plantada en diversos ámbitos de decisión y lugares geográficos. Sus resultados pueden consultarse en el libro editado por Von Schulenburg (16).

En España, se ha extendido el análisis al conjunto de las partes que intervienen directa o indirectamente en el consumo de fármacos de los pacientes –estos últimos quedan excluidos por necesitar la prescripción indicada por el médico, y carecer de la soberanía para su consumo, en la mayoría de las situaciones-. Con el patrocinio del proyecto FIS 98/1543 se ha desarrollado esta tarea durante los dos últimos años. Seguidamente, se detallan, de forma resumida, los métodos y resultados más representativos que pueden ser muy orientadores para conocer la madurez que tiene esta forma de trabajo entre los agentes sanitarios. Otros componentes de la investigación pueden encontrarse en Juárez y Antoñanzas (17).

La muestra

Para acceder a los agentes sanitarios involucrados en la adopción de decisiones relacionadas con los medicamentos –y también con otras tecnologías sanitarias, ya que los objetivos del estudio eran más amplios- se han clasificado en varios grupos dependiendo de su ámbito de trabajo: funcionarios de la Dirección General de Farmacia, representantes del grupo de trabajo del Consejo Interterritorial de Salud para la evaluación de tecnologías sanitarias, gerentes de atención primaria y especializadas, farmacéuticos y médicos de ambas clases de atención, además de algunos representantes de la industria farmacéutica.

Para seleccionar a los entrevistados se recurrió a las respectivas asociaciones profesionales, que facilitaron las direcciones de los médicos y farmacéuticos, y a las subdirecciones de atención primaria y especializada del INSALUD. No se empleó ninguna estratificación en la muestra sino que se aplicó, cuando fue preciso, el criterio de accesibilidad geográfica para celebrar reuniones (aprovechando la asistencia de los entrevistados a congresos, cursos o reuniones de trabajo) o bien se intentó

cubrir a toda la población censal del grupo estudiado (por ejemplo, en el caso de los farmacéuticos de atención primaria).

La forma de la entrevista

El método de estudio consistió en realizar un conjunto de entrevistas semiestructuradas en grupos de unas 10 personas, permitiendo que se estableciera un diálogo entre los asistentes, sin buscar un acuerdo entre las opiniones (técnica cualitativa de investigación social denominada en inglés “focus group” y traducida como grupo “focal”, - véase Meron (18) y Morgan (19) para una descripción más amplia de la técnica-). Las preguntas de las entrevistas se han adaptado del cuestionario incluido en el libro de Von Schulenburg, mencionado anteriormente, al grupo de agentes sanitarios concreto. También se tradujo al castellano el cuestionario postal empleado por el grupo de investigadores y coautores de la obra citada, en otros países. En la tabla 1 se resume el conjunto de grupos a quienes se ha entrevistado con los diferentes métodos señalados.

TABLA 1
Clasificación de los agentes sanitarios e instituciones según los métodos de la entrevista

DECISORES	CUESTIONARIO POSTAL	GRUPO FOCAL
Dir. Gral. De Farmacia		X
Farmacéuticos de At. Prim.	X	X
Farmacéuticos Hospitalarios	X	X
Gerentes de At. Primaria		X
Gerentes de At. Especializ.		X
Médicos de At. Primaria		X
Médicos de At. Especializ.	X	
Profesionales de la Industria Farmacéutica		X
Grupo de Trabajo del Consejo Interterritorial para la evaluación de tecnologías sanitarias		X

Las preguntas del “grupo focal” trataban de averiguar cuál era la principal tarea, desempeñada por los entrevistados, que conllevara una asignación de recursos o que más les preocupase. Tras comentar este particular, se pasaba a preguntar con qué criterios se adoptaban las decisiones, se cuestionaba si se usaba la evaluación económica y, en caso contrario, se intentaban averiguar los problemas o barreras para su empleo. Los resultados de las sesiones fueron enviados para su aprobación a los participantes junto con un breve cuestionario en el que habían de manifestar su grado de acuerdo (en una escala Lickert de 1 a 5 –de nada importante a muy importante-) con los enunciados. El sentido de esta actividad era el de evitar que al haber personas influyentes dentro de cada grupo, los otros miembros aceptaran las opiniones de quienes pudieran considerarse líderes de opinión sin poder mostrar su disconformidad. En la presentación de los resultados se han recogido las cuestiones valoradas a partir de 3.

En el cuestionario postal, las preguntas se dirigían a estudiar el conocimiento de las técnicas de evaluación económica; para ello se solicitaban dos títulos o referencias de algunos estudios que más habían influido en la adopción de decisiones y se preguntaba si se había detectado algún conflicto ético en la aplicación de los criterios de la evaluación económica. También se ofrecían dos listas cerradas de las posibles causas que impedían la generalización del empleo de las técnicas de evaluación económica y de los obstáculos que habría de remover para facilitar su empleo utilizando también una escala Lickert de 1 a 5, y anotando los conceptos que eran puntuados a partir de 3 y por el menos la tercera parte de los entrevistados.

Algunos resultados

Como resultado general, en su conjunto, independientemente del método de entrevista empleado, la conclusión es que se detectó un escaso conocimiento de los pormenores de las técnicas de evaluación económica y un empleo esporádico de los resultados obtenidos acerca de la medición de la eficiencia en las decisiones sanitarias; no obstante, todos los grupos han manifestado el potencial que tiene esta nueva clase de información para la adopción de decisiones. También se constató que no parece existir

un conflicto ético en la aplicación de los criterios económicos en las decisiones sanitarias.

Las barreras para el empleo de la evaluación económica se han clasificado en tres clases: administrativas, del método, y carácter práctico. En lo que sigue, se describirán aquellas que han sido especialmente identificadas por los farmacéuticos de atención primaria y especializada. En Antofagasta (20) pueden revisarse otros resultados pertenecientes a los diferentes grupos participantes en el estudio.

Así entre las barreras administrativas se han considerado que los problemas para cambiar los recursos de un concepto a otro, la rigidez de los presupuestos a la hora de liberar recursos para otros empleos, el hecho de que el control del gasto es más importante que el conocimiento del cociente coste/efectividad, y la ausencia de un requisito administrativo para su elaboración son decisivos a la hora de facilitar el uso del nuevo instrumento de la evaluación. A su vez, los profesionales de las empresas farmacéuticas han considerado como una barrera administrativa la escasa conciencia de los incrementos del gasto sanitario en otras áreas distintas de la de farmacia.

El método de la evaluación económica está desarrollándose en la actualidad (al igual que el de las otras evaluaciones antes citadas); sin embargo, la percepción por parte de los entrevistados de la situación de este instrumento de análisis les ha llevado a indicar que su empleo se ve reducido porque los estudios necesitan demasiadas hipótesis para que sean aplicables en el mundo real, porque los ahorros mostrados en los estudios son teóricos y no reales, porque los estudios de evaluación económica son sofisticados y difíciles de leer, y por la existencia de muchas partidas distintas de costes que dificultan la comparación con otros estudios.

Además, los farmacéuticos también manifestaron que el patrocinio de los estudios –frecuentemente de la industria farmacéutica– puede influir en los resultados, y que generalmente los estudios leídos versaban sobre problemas distintos a los cotidianos. Es decir, que existían algunas limitaciones para aplicar directamente los resultados en la práctica asistencial.

El resto de los profesionales sanitarios entrevistados también consideró algunos de estos elementos citados como una limitación para el

empelo de los instrumentos de la evaluación, junto con otros que podían afectar más de cerca su ámbito de trabajo.

No obstante, los diferentes grupos entrevistados han resaltado el gran interés existente por evaluar las condiciones de eficacia y seguridad referentes a sus ámbitos de decisión. Sólo algunos grupos han mostrado su interés en los aspectos relacionados con el coste de las tecnologías sanitarias (especialmente, cuando existen dos tecnologías que generan iguales resultados), y otros sólo mostraban una preocupación referida al cumplimiento del presupuesto asignado –por lo que el compartimento hermético de los diferentes niveles asistenciales dificultaba la valoración integral de la eficiencia por parte de los agentes sanitarios-.

En cualquier caso, varios grupos han destacado que más que la medición de la eficiencia –que parece complicada de interpretar y de validar- es más interesante, para facilitar la adopción de decisiones con implicaciones económicas, un estudio de las repercusiones estrictamente financieras o presupuestarias. Por tanto, en numerosas ocasiones, dado que la eficacia y seguridad son dos requisitos esenciales previos a cualquier decisión, la evaluación económica adoptaría la forma de un análisis de minimización de costes –que es la más fácilmente entendible y aplicable por partir del hecho de que los resultados sanitarios han de ser idénticos-, pero, haciendo la salvedad de que los costes son exclusivamente analizados en el entorno presupuestario más cercano para el agente sanitario (por ejemplo, se medirían únicamente los costes soportados por la Atención Primaria y no los otros costes derivados de la utilización de recursos en la Atención Especializada).

Es decir, que aunque los desarrollos teóricos científicos en el terreno de la evaluación económica aplicada al sector sanitario han sido abundantes, y las concreciones prácticas frecuentes –a juzgar por las publicaciones en revistas especializadas fácilmente accesibles para los profesionales sanitarios-, las repercusiones actuales en su labor diaria son realmente escasas.

A MODO DE RESUMEN

El entorno farmacéutico está en continuo cambio debido a varias razones: la necesidad de responder a las nuevas demandas motivadas por

las nuevas enfermedades o por mejorar las terapias existentes, las repercusiones de los cuantiosos recursos de I+D invertidos que impulsan cambios tecnológicos y, por tanto, también cambios en las conductas de los pacientes y profesionales sanitarios, las nuevas formas de comercialización de fármacos modificadas por las nuevas políticas económicas que integran a grupos de países, las regulaciones públicas de farmacovigilancia, inspección de productos, etiquetado, distribución, ect., las estrategias de fusiones de empresas como formas de responder a los nuevos retos de todo tipo, y las reformas dentro de las propias empresas creando nuevos departamentos y divisiones para adaptarse al nuevo entorno legal y económico, entre otras.

Al igual que antes se indicaba que el camino recorrido desde los años sesenta a favor de garantizar la seguridad y eficacia de los medicamentos, y, posteriormente, de su efectividad –aún con todos los problemas de aplicación de las nuevas técnicas- ha sido fundamental para el avance de la farmacia, dentro de unos años, es de prever, se considerará que la información aportada por la evaluación económica es de igual modo muy útil para garantizar que las elecciones relacionadas con los medicamentos contribuyan al bienestar social. No obstante, existen todavía hoy numerosas barreras que hay que ir limando para que tal instrumento sea aplicable por los diferentes participantes en las decisiones sanitarias relacionadas con los fármacos.

Como sugerencias para una agenda de trabajo pueden citarse: edición de una estandarización metodológica que sirva de guía para analistas y agentes sanitarios, completar los estudios de eficiencia con una medida de la repercusión presupuestaria, establecer una auditoría para los estudios de evaluación económica, facilitar cierta flexibilidad en los presupuestos, promover el empleo de los estudios de evaluación económica estableciendo los incentivos pertinentes entre los agentes sanitarios, y comenzar evaluando aquellas intervenciones sanitarias más estandarizadas de modo que sus resultados sean más fácilmente entendibles por los destinatarios. En resumen, es preciso tratar cuidadosamente los elementos integrantes de este cambio cultural, promovido por la evaluación económica aplicada a los medicamentos, para que pueda aunarse y constituir una solución a los problemas de las partes implicadas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) SUGDEN, R.; WILLIAMS, A. (1979) The principles of practical cost-benefit analysis. Oxford Univ.Press.,
- (2) DRUMMOND, M.; STODDART, G.L.; TORRANCE, G.W.(1987) Methods for the economic evaluation of health care programmes. Oxford Univ. Press.
- (3) WEINSTEIN, M.C.; PLISKIN, J.S.; STASON, W.B. (1977) Coronary artery bypass surgery: decision and policy analysis. En: lunker JO et al., eds. Costs, risks and benefits of surgery. Oxford Univ. Press, 57-85. New York.
- (4) ARTELLS, J.J.(1989) Aplicación del análisis coste-beneficio en la planificación de los servicios sanitarios. Masson-SG. Barcelona.
- (5) SACRITÁN, J.A.; BADÍA, X; ROVIRA, J. (1995) Farmacoeconomía: evaluación económica de medicamentos. Editores Médicos S.A. Madrid.
- (6) ROVIRA, J.; ANTOÑANZAS, F. (1995) Economic analysis of health technologies and programmes: a Spanish proposal for methodological standardization. *Pharmacoeconomics*, 8 (3): 245-252.
- (7) GARCÍA, A. (2000) Twenty years of health care economic analysis in Spain: are we doing well? En: Antoñanzas F., Fuster J, Castaño E (coord.) "Avances en la gestión sanitaria". XX Jornadas de Economía de la Salud. Palma de Mallorca. Mayo, 117-140.
- (8) PITCHARD, C (1998) Trends in economic evaluation. *Office of Health Economics, Briefing*, nº 36. London.
- (9) REAL DECRETO 561/1993, de 16 de abril por el que se establecen los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamento. BOE nº 114, de 13 de mayo de 1993.
- (10) NOVELL, A.J.; NAVARRO-RUBIO, M.D. (1995) Evaluación de la evidencia científica. *Medicina Clínica (Barc)* 105: 740-741.
- (11) SOTO, J.; GALENDE, I.; SACRISTÁN, J.A. (1994) Calidad de los ensayos clínicos publicados en España: valoración a través de análisis de 3 revistas durante el periodo 1985-1991. *Medicina Clínica (Barc)* 102: 241-245.
- (12) CARRÉ, M.C.; JIMÉNEZ, J.; MARTÍN, M.; JANÉ, F. (1996) La estadística en la investigación clínica de medicamentos. Estudio de artículos originales procedentes de centros españoles. *Medicina Clínica (Bar)* 106: 611.616.
- (13) STEWART, L.A.; CLARKE, M.J. (1996) Practical methology of metanalysis (overviews) using updated individual patient data. *Statistics in Medicine* 14: 2057-2079.
- (14) SACRISTÁN, J.A.; SOTO, J.; GALENDE, I. (1998). Evaluación de la efectividad mediante asignación aleatoria utilizando bases de datos: ¿evidencia basada en la medicina?. *Medicina Clínica (Barc)*, 111: 623-627.
- (15) LEY 25/1990 de 20 de diciembre, del Medicamento. BOE nº 306, de 22 de diciembre de 1990.

- (16) GRAF VON DER SCHULENBURG, J.M. (ed.) "The influence of economic evaluation studies in health care decision-making. IOS Press. Berlín.
- (17) JUÁREZ, C.; ANTOÑANZAS, F. (200). Impact of the studies of economic evaluation in health care decision-making. En: F. Antoñanzas, J. Fuster, E. Castaño (coord.) Avances en Gestión Sanitaria. XX Jornadas de Economía de la Salud, Plama de Mallorca, Mayo de 2000. ISBN: 84-89754-67-5. Págs: 141-150.
- (18) MORGAN, D.L.; KRUEGER, R.A. (1994) The focus group kit. Sage Publications. London.
- (19) MERON, R.; FISKE, M.; KENDALL, P. (1994) The focused interview: a manual of problems and procedures (2nd ed.) Free press. New York.
- (20) ANTOÑANZAS, F.; FIGUERAS, M.; ROVIRA, J. (2000) Report of the Spanish field work. In J-M Graf von der Schulenburg (ed.) "The influence of economic evaluation studies in health care decision-making. IOS Press. Berlín, 89-98.

Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano

ESTEPA, V.; RÓDENAS, S.; MARTÍN M.C.

Sección Departamental de Química Analítica

*Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040. Madrid
(España)*

RESUMEN

Como consecuencia del metabolismo celular normal, se producen radicales libres que generalmente son eliminados por receptores endógenos pero también pueden interaccionar con los lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. Dada la naturaleza inestable de los productos de la peroxidación lipídica resulta dificultoso determinar la magnitud de dicha peroxidación. Es, sin embargo, más accesible determinar los productos de su degradación metabólica, constituidos fundamentalmente por aldehídos de alta capacidad reactiva, siendo el más significativo el malondialdehído (MDA).

Entre la variedad de métodos analíticos desarrollados para determinar el daño oxidativo de los lípidos, el más comúnmente utilizado se basa en la reacción del malondialdehído con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para formar aductos cromógenos y fluorescentes de MDA-TBA muy estables y que se pueden cuantificar por espectrofotometría de absorción visible o por fluorimetría.

En el presente trabajo, para la determinación de lipoperóxidos en suero humano se ha empleado una técnica colorimétrica basada en la reacción del TBA descrita por ASAKAWA y MATSUSHITA. Para la optimización de esta técnica fueron cuidadosamente analizadas las condiciones de reacción establecidas por estos autores

introduciéndose modificaciones que afectan principalmente al tiempo de reacción y al método de extracción de los lipoperóxidos.

Palabras clave: Aductos MDA-TBA.- Peroxidación lipídica.- Reacción del TBA.

SUMMARY

A optimized method for the analysis of the lipidic peroxidation in human serum

A variety of free radicals are produced in human organism as a consequence of normal cell metabolism. These free radicals are generally removed by endogenous scavengers but also can interact with plasma and tisular lipids causing its peroxidation.

It is very difficult to determine the magnitude of the peroxidation and also the first lipidic peroxidation products due to their very short half-life. However the evaluation of the secondary lipidic peroxidation products can be quantitatively determined as well as their degradation products such as aldehydes with high reactivity among them malondialdehyde (MDA) is the most relevant.

Among the variety of assays developed to estimate the magnitude of oxidative damage in humans, the most commonly employed is based on the reaction of endogenous malondialdehyde (MDA) with 2-thiobarbituric acid (TBA). This reaction yields very stable cromogenic and fluorogenic MDA-TBA adducts, that are detectable by UV spectrophotometry and fluorimetry.

In the present study, a colorimetric method described by ASAKAWA and MATSUSHITA, was optimized to determine the human serum lipoperoxides based on the TBA reaction. The reaction conditions established by these authors were rigorously investigated in order to optimize this procedure. Mainly, changes were introduced relating to the reaction time and the lipoperoxides extraction method.

Key words: MDA-TBA aducts.- Lipidic peroxidation.- TBA reaction.

INTRODUCCIÓN

En el organismo humano, como consecuencia del metabolismo celular normal, se producen radicales libres que generalmente son eliminados por receptores endógenos pero también pueden interaccionar con los lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. La peroxidación lipídica juega un papel importante en la patogénesis y gravedad de diversas enfermedades.

La determinación de la magnitud de la peroxidación lipídica es dificultosa debido a que los productos de la misma son muy reactivos y de corta vida. Por ello se determinan los productos de la degradación metabólica de los lipoperóxidos, como los isoprostanos y los isómeros de la prostaglandina producidos a partir del ácido araquidónico a través de una vía metabólica catalizada por radicales libres y que se eliminan por orina (1). Pero son, fundamentalmente, los diferentes aldehídos reactivos formados por la descomposición de los peróxidos lipídicos presentes en el suero los que son objeto de cuantificación. El malondialdehído (MDA) es el aldehído más significativo obtenido en dicha degradación y también el más cuantificado (2, 3, 4).

Entre la variedad de métodos analíticos desarrollados para determinar el malondialdehído endógeno el más comúnmente utilizado se basa en la reacción del mismo con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (5, 6, 7). El MDA, en condiciones de bajo pH y alta temperatura, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando lugar a un aducto MDA-TBA cromógeno o pigmento rojo que es detectable por espectrofotometría o por fluorimetría.

Ciertos autores enfatizan que el ensayo del TBA no es útil para la determinación de la peroxidación lipídica en el suero humano por falta de especificidad. El MDA que se forma in vivo tiene una vida media muy corta, pues reacciona rápidamente con grupos amino libres procedentes de los fosfolípidos, aminoácidos y proteínas presentes en el suero, dando productos fluorescentes. Estos grupos amino libres también compiten con el MDA por su capacidad de unirse al TBA. Por otro lado, existen fuentes no lipídicas en el suero como los carbohidratos y las glicoproteínas que producen aductos MDA-TBA durante la reacción colorimétrica. Además, el TBA también reacciona con varios compuestos presentes en el suero (pirimidinas, hemoglobina y bilirrubina) y con sus productos de oxidación para formar compuestos que interfieren en los ensayos fluorimétricos y espectrofotométricos. Sin embargo, aunque poco específica, la reacción del TBA se considera un método muy sensible para la determinación de la peroxidación lipídica en tejidos animales (8, 9) y con tal finalidad se utiliza con frecuencia. Distintos autores han empleado esta reacción para

analizar la peroxidación lipídica en muestras de suero o plasma humano (9, 10, 11, 12).

El objetivo de este estudio ha sido determinar las condiciones experimentales óptimas para la determinación de los lipoperóxidos en suero mediante la reacción con TBA, con el fin de establecer una pauta de trabajo que permita el análisis rutinario y la obtención de resultados reproducibles. El método empleado ha sido desarrollado siguiendo el método de ASAKAWA y MATSUSHITA (11), autores que proponen una técnica aplicable a la microdeterminación de lipoperóxidos en suero o plasma humano. Hemos estudiado rigurosamente las condiciones de reacción propuestas por estos autores y hemos introducido algunas modificaciones, que afectan principalmente al tiempo de reacción y al método empleado para la extracción de los lipoperóxidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Reactivo cromógeno de ácido tiobarbitúrico (TBA):** disolución de 5 g/L de ácido tiobarbitúrico (4,6-dihidroxipirimidina-2-tiol) en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,3% (V/V) en agua destilada.
- **Reactivo antioxidante:** disolución de 2,2 g/L de butil-hidroxi-tolueno (BHT) en etanol.
- **Disolución tampón de HCl-glicocola a pH=3,5:** disolver 75,05 g de glicocola y 58,44 g de NaCl en 900 mL de agua destilada, ajustar a pH 3,5 con hidróxido de sodio 0,1 M y completar a 1000 mL con agua destilada.
- **Reactivo catalizador:** disolución de 2,7 g/L de tricloruro de hierro (III) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, en agua destilada.
- **Disolución patrón de malondialdehído:** disolución al 20% (V/V) de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) en disolución tampón a pH = 3,5, con la adición de 400 μL de HCl 1N con el fin de favorecer la hidrólisis del producto.

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción, previo ayuno de 12 a 14 horas. Paralelamente se distribuyeron alicuotas de sangre en tubos sin anticoagulante y en tubos con EDTA disódico como anticoagulante. Se centrifugaron a 2.500 g, a temperatura ambiente y en el suero o plasma resultante se analizaron inmediatamente los peróxidos lipídicos o bien, en los casos en que no fue posible el análisis inmediato, se conservaron a - 20° C un máximo de 30 días en tubos de ensayo exentos de elementos traza con el fin de mantener la estabilidad de las muestras y para prevenir la autoxidación.

Las determinaciones espectrofotométricas de absorción en la región del visible, se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz Uvikon-810 de la casa KONTRON-INSTRUMENTS, programable y con registro automático.

La precisión se determinó a partir de los coeficientes de variación intra e Inter.-día. La comprobación de la normalidad de la distribución se realizó por medio del test de Kolmogorov. La comparación de las poblaciones por el test de Student. Los coeficientes de correlación se obtuvieron a partir de la r de Pearson.

PROCEDIMIENTO DE OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE LA REACCIÓN TBARS

Los parámetros analizados en esta optimización fueron:

- 1- Análisis del tipo de muestra
- 2- Calibración de la reacción del TBA
- 3- Reactivos y condiciones de reacción
- 4- Método de extracción
- 5- Detección y cuantificación

1.- Análisis del tipo de muestra

Este método es aplicable tanto a suero como a plasma (11), como se pudo comprobar en la determinación puntual de lipoperóxidos en ambos tipos de muestra. No se han encontrado variaciones estadísticamente significativas en los resultados obtenidos con muestras de plasma y con muestras de suero. No obstante, se estandariza el método eligiendo el suero como muestra para la determinación de la peroxidación lipídica.

Se comprobó que es necesario proceder al análisis en suero obtenido inmediatamente a partir de sangre recién extraída, para obtener resultados más exactos y reproducibles. De no ser posible el procesamiento inmediato, se puede conservar la muestra a -20°C hasta el momento de la determinación con el fin de evitar el fenómeno de lipoperoxidación *in vitro*.

Aunque HOVING y col. (12) proponen realizar la extracción previa de los lípidos en el plasma y trabajar sobre el extracto lipídico desecado, para prevenir reacciones de liberación de MDA de aquellos compuestos no lipídicos que contengan grupos amino libre, no se consideró necesario realizar un método tan complejo al comprobar que hay una alta correlación ($r = 0,98$) entre los resultados obtenidos utilizando este método de extracción y los obtenidos directamente en suero.

2.- Calibración

Los precursores de malondialdehído más utilizados son el 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) y el 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). El espectro de absorción obtenido con el TMP fue muy similar al obtenido con el TEP, como también corroboran otros autores (9, 13). Ambos precursores se hidrolizan en medio ácido, aunque más fácilmente el TMP que el TEP, proceso que se favorece con la adición de $400\ \mu\text{L}$ de HCl 1 N a la disolución madre, por lo que se pueden utilizar indistintamente ambos compuestos como patrón externo.

En este estudio se utilizó como patrón externo el 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). Se preparó una disolución de MDA diluyendo

20 μL de TEP en 100 mL de disolución amortiguadora de $\text{pH} = 3,5$. Con una posterior dilución al 1:10 se obtuvo una disolución con una concentración de $83,5 \mu\text{mol/L}$. A partir de esta disolución patrón se prepararon los patrones de concentraciones 0,42, 0,83, 1,67, 2,50, 4,17, 8,3 y $16,7 \mu\text{mol/L}$, con los que se realizó la calibración.

3.- Reactivos y condiciones de reacción

La mayoría de los métodos descritos se aplican a la determinación de estos productos en homogenados de tejidos. Nuestro estudio parte del método descrito por ASAKAWA y MATSUSHITA (11) en suero o plasma. La concentración de los reactivos utilizados varía de unos métodos a otros, según el tipo de muestra analizada, aunque todos coinciden en llevar a cabo la reacción en medio ácido y a alta temperatura. Si bien los reactivos empleados en el método finalmente adoptado fueron los mismos que emplea el método original de Asakawa y Matsushita, modificamos algunas condiciones de reacción.

La adición de iones Fe (III) se utiliza para optimizar la descomposición de los lipoperóxidos a MDA. Entre las sales de hierro, el $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ es eficaz a distintos pHs , en presencia de ácidos débiles y en medios alcalinos, y se comporta como catalizador de una reacción parcialmente inhibida por el BHT. La reacción de descomposición de hidroperóxidos a MDA es una reacción de radicales libres. Cuando coexisten ácidos grasos no oxidados en el medio de reacción tiene lugar una autooxidación. Para evitar la misma se añade el butil-hidroxi-tolueno (BHT) (11).

Tanto la sal de Fe (III) como el antioxidante son necesarios en la reacción del TBA cuando se prevee la existencia de ácidos grasos poliinsaturados.

La mayoría de autores enfatizan que el pH del medio es el factor más importante que afecta a la reactividad de los peróxidos de ácidos grasos con el TBA. Las condiciones de pH óptimas pueden ser determinadas en función de dos factores, la formación de productos

secundarios procedentes de la descomposición de hidroperóxidos, y la reacción de estos productos con el TBA.

Utilizamos el tampón HCl-glicocola a $\text{pH} = 3,5$ para crear las condiciones óptimas de pH. Este tampón es propuesto por ASAKAWA y MATSUSHITA (11), autores que apoyan su utilización, a partir de un estudio pormenorizado de varias disoluciones tampón. En su estudio lleva a cabo la reacción a varios pHs, y bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo, con la adición de tricloruro de Fe (III). Las intensidades de color más altas se obtuvieron con tres tampones: glicocola-HCl, glicocola-OHNa y acetato, siendo más nítido el color obtenido con el tampón glicocola-HCl a $\text{pH} = 3,5$.

Respecto al método original se ha variado el tiempo de reacción de 15 a 60 minutos a una temperatura de 95°C , para alcanzar una máxima coloración tanto en las muestras como en el TEP que se utilizó como patrón externo. Además se ha introducido un paso previo, manteniendo la mezcla de reacción a una temperatura de 5°C durante 60 minutos en la oscuridad. Este sistema de reacción conduce a resultados más reproducibles que si se procede a llevar a ebullición directamente como pudimos constatar experimentalmente (%CV = 8,3 vs. %CV = 18,6). Otros autores también proponen una etapa previa de reacción antes de llevar la mezcla de reacción hasta el punto de ebullición (14, 15), dada la mayor reproducibilidad de la técnica.

4.- Método de extracción

Para determinar el sistema de extracción idóneo probamos dos mezclas de reactivos:

MEZCLA (A): 1 mL de ácido acético conc. + 2 mL de cloroformo conc., según el método de ASAKAWA y MATSUSHITA (11).

MEZCLA (B): 0,5 mL de agua + n-butanol-piridina 15:1 (V/V) 2,5 mL, según el método de OHKAWA y col. (9).

Utilizando una mezcla de sueros como muestra control, se analizaron por duplicado diez alícuotas de la mezcla de sueros utilizando el reactivo de extracción (A) y, también por duplicado, diez alícuotas

utilizando el reactivo de extracción (B) (6,4% para la mezcla B vs. 11,87 % para la mezcla (A)), probablemente porque la mezcla cloroformo-ácido acético es más volátil, variando arbitrariamente el volumen final en el que se leen las absorbancias.

La mezcla n-butanol-piridina es propuesta también por PLACER y col (16) para incrementar la sensibilidad. OHKAWA y col. (9), aunque adoptan este medio de extracción, cuestionan la influencia de la adición de piridina sobre el espectro de absorción. Se pudo constatar un ligero incremento en la absorbancia al añadir piridina al n-butanol, por lo que concluimos que esta mezcla de disolventes orgánicos es la idónea para la extracción de los lipoperóxidos lipídicos; además el cromógeno extraído en este disolvente fue estable al menos 2 horas a temperatura ambiente.

5.- Detección y cuantificación

Para la detección y cuantificación se compararon dos métodos: espectrofotométrico, con lectura a una longitud de onda de 532 nm, y fluorimétrico, con ajuste de las longitudes de onda de excitación y emisión siguiente: $\lambda_{exc} = 515$ nm y $\lambda_{em} = 553$ nm (10). Se analizaron en ambos casos 10 muestras por duplicado. No se halló una diferencia estadísticamente significativa al comparar los resultados obtenidos por ambos métodos.

Elegimos, como la mayoría de los autores, y debido a su sencillez la determinación espectrofotométrica, aunque distintos autores proponen la cuantificación fluorimétrica en homogenados de tejidos para evitar interferencias

MÉTODO DE ANÁLISIS DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN SUERO

El método colorimétrico de TBARS propuesto por ASAKAWA y MATSUSHITA (11), modificado y optimizado en nuestro laboratorio se concreta del siguiente modo:

En tubos de ensayo de 10 mL de capacidad, se añaden respectivamente 100 μ L de suero (muestras problema), 100 μ L de H₂O destilada (muestra blanco), 100 μ L de disolución patrón (muestras patrón) o 100 μ L de disolución control (muestra control) y a continuación los siguientes reactivos en el orden que se describe:

- 1) 0,1 mL de reactivo antioxidante
- 2) 0,1 mL de reactivo catalizador
- 3) 1,5 mL de disolución tampón

Esta mezcla de reacción se mantiene 60 minutos a 5° C. Transcurrido este tiempo, se lleva a ebullición en un baño de agua a una temperatura entre 95° C y 100° C durante 60 minutos, para desarrollar la máxima coloración en todas las muestras y patrones. Los tubos se tapan con bolas de cristal como condensadores para evitar pérdidas de líquido por evaporación.

Una vez verificada la reacción, se procede a la extracción de los aductos con una disolución mezcla de 2,5 mL de una disolución de n-butanol-piridina (15:1 V/V) y 0,5 mL de agua destilada (9), enfriando previamente los tubos en un baño de hielo.

Tras mezclar y centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 minutos, las capas superiores o sobrenadantes se recogen en un tubo limpio y se procede a la lectura de las absorbancias a 532 nm, frente a un blanco de reactivos.

Tanto las muestras de suero, como las disoluciones patrones, control y blanco de reactivos, se procesan de la misma manera.

La técnica empleada se resume en la tabla siguiente:

RESUMEN DEL MÉTODO UTILIZADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LIOPERÓXIDOS EN SUERO HUMANO

MUESTRA: 100 µL de suero recién obtenido

PATRON EXTERNO: hidrólisis en medio ácido

1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) → → → → → Malondialdehído (MDA)

(disolución patrón de 83,5 µmol/L, de la que se obtienen los patrones de distinta concentración para la calibración)

REACTIVOS:

- 0,1 mL de disolución de Butil-hidroxi-tolueno (BHT) como antioxidante
 - 0,1 mL de disolución de Fe₃Cl₆H₂O como catalizador
 - 1,5 mL de disolución tampón glicocola-HCl de pH = 3,5
 - 1,5 mL de disolución de ácido tiobarbitúrico, como reactivo cromógeno
-

CONDICIONES DE REACCIÓN:

1ª Fase: 60 min. a 5° C en la oscuridad

2ª Fase: 60 min. a 95° C - 100° C, en baño maría

EXTRACCIÓN ADUCTOS MDA-TBA:

1. MEDIO DE EXTRACCIÓN: 2,5 mL de disolución de n-butanol-piridina (15:1 V/V) y 0,5 mL de agua destilada
 2. Mezclar y centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 min
 3. Recoger la capa superior o sobrenadante (aprox. 3 mL) en un tubo limpio
-

CUANTIFICACIÓN:

Lectura espectrofotométrica a 532 nm

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de comprobar la utilidad clínica de este método en la prevención del desarrollo de aterosclerosis en pacientes diabéticos se realizó un estudio con 56 individuos que participaron en una Campaña de Prevención de la Diabetes realizada en la Escuela de Perfeccionamiento Profesional de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (17). Este grupo estaba constituido por personas de ambos sexos que no presentaban antecedentes clínicos de interés, con edades comprendidas entre 18-65 años, con un nivel socioeconómico medio y hábitos dietéticos similares. No consumían alcohol, ni eran fumadores y tampoco estaban sometidos a ninguna medicación.

Para controlar su estado de salud se determinaron los parámetros hematológicos y bioquímicos convencionales y se excluyeron los sujetos que presentaban alguna alteración.

Los datos obtenidos indicativos del valor promedio, desviación estándar y otros resultados estadísticos se reseñan en la siguiente tabla.

**PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE LA PERÓXIDACIÓN LIPÍDICA
(μ moles/L) EN UNA POBLACIÓN CONTROL**

Parámetro	Resultados
Número (N)	56
Media aritmética	2'35
Mediana	2'03
Moda	1'30
Valor máximo	6'50
Valor mínimo	0'20
Intervalo	6'20
Coef. Curtosis	1'84
Coef. Asimetría	1'25
Desviación típica	1'35
%Coef. Variación	57'41

Se observa en la población control una gran dispersión (%CV = 57). Esto puede ser indicativo del diferente contenido de sistemas antioxidantes en las muestras de suero analizadas. En la Figura (1) se observa el diagrama de frecuencias de esta población, que permite observar gráficamente la distribución de la población y su grado de

dispersión.

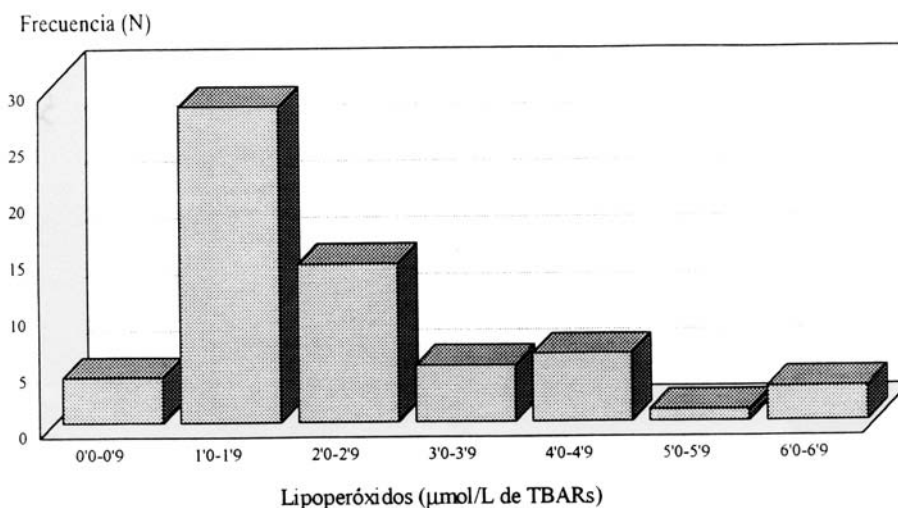


Figura 1.- Distribución de los lipoperóxidos en una población control

Teniendo en cuenta que la población control analizada por nosotros tiene una edad media de 34 ± 13 años, los resultados obtenidos ($2,35 \pm 1,35$) son inferiores a los indicados por YAGI (18) que establece una cantidad de TBARs de $3,41 \pm 0,50$ ($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{moles/L}$ en individuos de edades entre 31-40 años.

HOVING y col. (12), refieren valores medios de $1,30 \pm 0,23$ $\mu\text{mol/L}$ de TBARs para una población de 24 individuos adultos sanos, con una edad media de 34 años dentro de un rango de 22-54 años. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en nuestra población ($2,35 \pm 1,35$ $\mu\text{mol/L}$) observamos que existe una diferencia estadísticamente significativa. Si seleccionamos en nuestra población el intervalo de edad estudiado por HOVING (12), es decir, individuos de edad comprendida entre 22-54 años, resulta un subgrupo de 47 individuos sanos con una cantidad media de TBARs de $1,99 \pm 0,89$ ($\bar{x} \pm s$)

$\mu\text{moles/L}$, más próxima al dato aportado por Hoving, pero que resulta todavía significativamente más alta. Esta divergencia en concreto, puede deberse a la utilización de diferentes derivados del TBA, los derivados 1,3-dietil y 1,3-difenil, en la estandarización del método de determinación de lipoperóxidos, y al empleo de extractos lipídicos en lugar de suero total. También los datos de peroxidación lipídica ($0,99 \pm 0,30 \mu\text{moles/L}$) aportados recientemente por PIECHOTA y col. (19), determinados mediante un método de cuantificación colorimétrica de MDA (malondialdehído) y 4-HNE (4-hidroxi-alquenos) comercializado por Bioxytech (19), son inferiores a los obtenidos en nuestro laboratorio. Este último método ha sido utilizado también por DIAZ (20) en la determinación en plasma de un grupo de 83 varones ($1,48 \pm 0,20 \mu\text{moles/L}$) y en un grupo de 87 mujeres ($1,33 \pm 0,21 \mu\text{moles/L}$); se obtiene una diferencia significativa entre los dos grupos de diferente sexo.

Los valores de referencia de malondialdehído obtenidos por LONDERO y col. (21) en muestras de plasma, por separación de los aductos MDA-TBA en una columna de HPLC en fase inversa C_{19} y detección espectrofluorimétrica son significativamente inferiores a los hallazgos por métodos colorimétricos ($0,85 \pm 0,25 \mu\text{moles/L}$), lo que es indicativo de la mayor especificidad de la técnica cromatográfica. Además estos autores realizan las determinaciones en plasma obtenido con EDTA como anticoagulante y ponen de manifiesto que los resultados son inferiores a los obtenidos cuando se utiliza suero o plasma heparinizado.

CONCLUSIONES

El método colorimétrico de determinación de lipoperóxidos séricos propuesta por ASAKAWA y MATSUSHITA (11) modificado y optimizado en nuestro laboratorio, permite disponer de un procedimiento analítico sencillo, rápido y fiable que se puede introducir dentro de la rutina de trabajo de un laboratorio de análisis clínicos. Los dos puntos fundamentales de optimización y de modificación del método han sido el

tiempo de reacción y el sistema de extracción de los adultos de malondialdehído y de ácido tiobarbitúrico.

Los intervalos de referencias obtenidos para una población de 34 ± 13 años son inferiores a los obtenidos en una población similar por otros autores (Yagi (18)) utilizando el método colorimétrico de ASAKAWA y MATSUSHITA ($2,35 \pm 1,35$ vs. $3,41 \pm 0,50$) lo que puede ser indicativo del incremento de especificidad obtenido al modificar el método en nuestro laboratorio.

Por otro lado, la variación interindividual en nuestra población es bastante manifiesta ($X_{\max} = 6,50$ y $X_{\min} = 0,20$). Una explicación general a la diferencia en los valores medios y a la alta dispersión de resultados es la variabilidad interindividual que ha sido hallada en diferentes trabajos (20, 22, 23) indicativa del diferente contenido en sistemas antioxidantes debido entre otros factores a la edad, sexo, dieta, estrés, herencia, hábito de fumar o no, etc., pero también a variables metodológicas, problemas relacionados con el muestreo y a las limitaciones propias de cada método. Es preciso, por tanto, considerar estos factores en el momento de establecer valores de referencia de lipoperóxidos (24, 25) y también se hace necesario proceder a la estandarización de los métodos utilizados en su determinación.

BIBLIOGRAFIA

- (1) PRATICO, D.; BARRY, O.P.; LAWSON, J.A.; ADIYAMAN, M. y col. (1998): *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (7) : 3449 – 3454.
- (2) PRYOR, W.A.; STANLEY, J.P. (1975): *Lipids* 11 : 370-379.
- (3) JANERO, D.R. (1990): *Free Radic. Biol. Med.* 9 : 515-540.
- (4) LAZZARINO, G.; TAVAZZI, B.; DI PERRO, D; VAGNOZZI, R.; PENCO, M.; GIARDINA, B. (1995): *Biol. Trace Elem. Res.*, 47 (1-3) : 165-170.
- (5) PETIT, E.; CHANCERELLE, Y.; DUMONT, E.; DIVOUX, D.; KERGONOU, F.; NOUVELOT, A. (1995a): *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36(2) : 355-364.
- (6) PETIT, E.; DIVOUX, D.; CHANCERELLE, Y.; DEKERGONOU, J.F.; NOUVELOT, A. (1995b): *Biol. Trace Elem. Res.* 47 (1-3) : 17-27.

- (7) KIKUGAWA, K.; KOJIMA, T.; YAMAKI, S.; KOSUGI, H. (1992): *Analytical Biochemistry* 202 : 249-255.
- (8) PATTON, S; KURTZ, G.W. (1951): *J. Dairy Sci.* 34: 669-674.
- (9) OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. (1979): *Anal. Biochem.* 95 : 351-358.
- (10) YAGI, K. (1976): *Biochem. Med.* 15 :212-216.
- (11) ASAKAWA, T.; MATSUSHITA, S. (1979): *Lipids* 15 (3), 1979.
- (12) HOVING, E.B.; LAING, C.; RUTGERS, H.M.; TEGGELER, M.; Van DOORMAAL, J.J.; MUSKIET, F.A.J. (1992): *Clinica Química Acta* 298: 63-76.
- (13) SINNHUBER, R.O.; YU, T.C.; CHANG, Y.T. (1958): *Food. Res.* 23 : 626-634.
- (14) KOSUGI, H.; KOJIMA, T.; KIKUGAWA, K. (1991): *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68: 51-55.
- (15) KIKUGAWA, K.; KOJIMA, T.; KOSUGI, H. (1991): *Eisei Kagaku (Japan)* 37 : 47-52.
- (16) PLACER, Z.A.; CUSHMAN, L.L.; JOHNSON, B.C. (1966): *Anl. Biochem.* 16 : 359-364.
- (17) ESTEPA, M.V.; RÓDENAS, S.; RAPOSO, R.; MÉNDEZ, M.T. (1995): *Análisis Clínicos*, XX, 78 – I : 28-32.
- (18) YAGI, K. (1994): *Adv. Exp. Med. Biol.* 366: 1-15.
- (19) PIECHOTA, W.; JOZEFCAK, E.; BEJM, J.; WADOWSKA, E.; TKACZEWSKI, K. (1999): *Clinical Chemistry* 45 (6) Suppl. A: 14 – 15.
- (20) DIAZ, J.; SERRANO, E.; ACOSTA, F.; CARBONELL, L.F. (1998): *Clinical Chemistry* 44 (10) : 2215 – 2216.

- (21) LONDERO, D.; LO GRECO, P. (Istituto Chimica Clinica, Udine, Italy) (1997): *G. Ital. Chim. Clin.* 21 (1) : 7 – 12.
- (22) MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.L.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. (1993): *Clin. Sci. (Lond)* 84 : 407 – 12.
- (23) KUZ'MENKO, A.I.; KLIMENKO, E.P., DONCHENKO, G.V. (1997): *Bull. Exp. Biol. Med.* 124 (9) : 885 – 887.
- (24) IFCC (1983): *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21 : 749 – 60.
- (25) SOLBERG, H.E. (1994): Establishment and use of reference values. In: Bustis, C.A.; Ashwood, E.R., eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders : 454 – 84.

**Refuerzo epidérmico de la impermeabilidad
actínica y oposición a la deshidratación:
Uso de vehículos multifásicos.**

GUEDES BAHIA, M.F., PENA FERREIRA, M.R., Y SANTOS, D.
*Centro de Tecnologia do Medicamento — Departamento de Tecnologia
Farmacêutica.- Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
Rua Aníbal Cunha, 164 • 4050 Porto • PORTUGAL*

RESUMEN

Dada la necesidad de reforzar la capa corneal en relación con los rayos solares evitando su penetración en la epidermis viable y la pérdida de agua fisiológica, se propone la inclusión de filtros e hidratantes en un vehículo multifásico selectivo. La estabilidad y la eficacia del sistema traducidas en la selectividad de cesión dependen de la elección de los materiales que determinan las características individuales de las fases presentes y de la conjugación fases/interfases.

Palabras clave: Coeficiente de difusión.- Emulsión múltiple.- Filtro solar.- Hidratante.- Viscosidad.

SUMMARY

**Epidermic reinforcement of the actinic permeability and resistance to dehydration:
Use of multiphasic vehicles.**

Aiming the reinforcement of the stratum corneum to prevent the penetration of the actinic radiations on viable epidermis and to improve the opposition to dehydration,

the inclusion of sunscreens and moisturisers on a selective multiphasic vehicle is proposed. The stability and efficacy of the system, put in evidence by the selective release, depended on the materials selection which determine the individual characteristics of each phase and of the phases/interphases combination.

Keywords: Diffusion coefficient.- Multiple emulsion.- Sunscreen.- Hydrating.- Viscosity.

INTRODUCCIÓN

La epidermis constituye la primera barrera a los rayos solares, los cuales pueden provocar quemaduras, varios tipos de dermatosis actínicas y cáncer de piel, además de considerarse la primera causa externa del envejecimiento cutáneo. El refuerzo de las defensas naturales, llamadas “capital sol”, se considera indispensable cuando se produce la exposición solar. Se acelera también la pérdida de agua fisiológica difundida desde el interior hacia la atmósfera por acción calorífica directa de los rayos infrarrojos y, a su vez, por el exceso de cloruro de sodio que queda cristalizado en el estrato corneo después de bañarse en el mar. Las entidades res-ponsables de la salud pública incentivan el uso adecuado de preparaciones que aumenten la defensa contra los rayos ultravioletas, pero por otro lado se tiene que alertar sobre el peligro de la deshidratación.

Las sustancias incorporadas en estas prepara-ciones con capacidad de absorber la energía de los rayos UV se designan através de filtros solares selectivos o filtros químicos. Se incluyen al mismo tiempo derivados de los ácidos p-aminobenzoico (más usados en los EE.UU.), salicílico, cinámico (preferidos en la Unión Europea), benzofenonas y otros, que constan nominalmente con llas respectivas concentraciones en las listas específicas y, para tal efecto, legisladas en cada país.

A dichos compuestos, además de una determinada capacidad de absorción entre 280 y 400 nm, se les exige que sean hipoalergénicos y que no interfieran con los demás constituyentes de las formulaciones donde puedan figurar.

Los filtros denominados opacos, físicos, bloque-adores o de pantalla total son sustancias con poder de reflejar, dispersar y absorber los rayos UV y visible, dependiendo de su granulometría. Son ejemplos

de este grupo las micas, el talco, el almidón, el óxido de hierro, el óxido de zinc y el dióxido de titanio (1-3).

Los filtros aislantes térmicos, aún sin legislación específica, se encuentran en algunos productos anti-solares, siendo compuestos que absorben en las bandas más elevadas de longitudes de onda (800 a 4000 nm) y que determinan la protección IR.

Para respetar las exigencias de la asociación de los diversos tipos de filtros con propiedades fisico-químicas diferentes, y a su vez la necesidad de hacer funcionar la barrera frente a la pérdida transepidérmica de agua y que finalmente se pueda obtener una preparación que satisfaga el hedonismo de los consumidores y que obligue al formulador el diseño de las diferentes fases, pero convenientemente articuladas. Una propuesta que iniciaron estos autores fue la utilización de una emulsión triple como vehículo que contenía humectantes e hidratantes en las fases acuosas, de un filtro químico en fase grasa y de un filtro físico en suspensión en la fase más externa. Esta capa es la primera en contactar con los queratocitos, presentando los filtros físicos un bajo potencial de irritación y de sensibilidad para la piel como lo que se describe en algunos prospectos de diferentes productos solares (3,4).

MATERIAL Y MÉTODOS

La formulación y preparación de la emulsión agua/aceite/agua (A/O/A) se realizó en dos etapas:

1 – La emulsión primaria con la composición abajo descrita se obtuvo con la ayuda de un agitador de turbina, en alta velocidad durante un periodo de tiempo corto (10 min.)

Agua	16,48%
Ácido láctico	0,66%
Urea	0,66%
Tween 80	1,1%
Span 80	2,2%
Padimato O (CAS # 21245-02-3)	8,2%

(E.C. 2.5) (Colipa 8)

Aceite mineral.....70,7%

pH: 2,8

2 – La segunda etapa se procesó durante un tiempo más largo, dispersando la emulsión primaria en la fase hidrófila siguiente (80:20) mediante un agitador magnético:

Tween 80 5%

Metilcelulosa un 2% con un 2,5% de O₂Ti,

un 0,15% de nipagin e un 0,2% de nipasol..... 84%

Glicerina 5%

Lactato de sodio a un 50%..... 4%

Urea 2%

El final de la operación se encontró por observación microscópica. La preparación final tuvo como resultado pH 4,1.

La multifuncionalidad de estas vesículas se debe a la fase más interna constituida por los compartimentos acuosos hidratantes dispersos en la solución grasa del filtro químico a base de una interfase con dos agentes emulsivos no iónicos y de la dispersión de esta emulsión interna O/A en una suspensión del filtro físico en gel hidrófilo emoliente e hidratante con conservantes. Se trata de una emulsión de segundo orden con tres componentes y dos interfases. Dichos componentes consisten en una fase oleosa y dos fases hidrófilas diferentes (solución y suspensión).

La determinación del HLB (10,1) de la preparación se obtuvo según la fórmula (4):

$$HLB = \frac{HLB1\Phi(A/O/A)p1\% + HLB2p2\%}{\Phi(A/O/A)p1\% + p2\%} \quad (1)$$

Donde HLB1 y HLB2 representan respectivamente el HLB de los agentes emulsivos internos y del agente emulsivo externo; $\Phi(A/O/A)$ es la fracción en volumen de la emulsión A/O en la emulsión múltiple; p1% y p2% son respectivamente los porcentajes de los agentes primarios y secundarios.

Se determinó experimentalmente la fracción en volumen resultando 0,833. Se realizó la clasificación dimensional mediante microscopía: emulsión Tipo B (9 - 25 μm); suspensión (< 2,5 μm)

Se determinaron los parámetros reológicos mediante en Reómetro Carri-Med. La emulsión mostró comportamiento pseudo-plástico según el perfil de viscosidad; sistema viscoelástico dado el análisis de los módulos G' , G'' y η^* en los perfiles de frecuencia ω .

Espectrofotometría de UV (espectrofotómetro Hitachi U-2000): se procedió a extracciones del filtro en la emulsión primaria y en la emulsión triple registrándose los espectros a 310 nm. Para el control se realizaron extracciones en las respectivas emulsiones sin filtro, según la técnica anterior. La absorción se debió exclusivamente al Padimato O (octildimetil PABA).

Dosis del filtro por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un cromatógrafo Varian, bomba Mod. 9012, detector UV Mod. 9050 con las siguientes condiciones cromatográficas: columna C18 Bondpack, fase móvil: metanol/agua (80:20), flujo: 1 ml/min, detección UV a 310 nm, a temperatura ambiente. Tales condiciones se basaron en un trabajo de M.O. Masse et al. (1991) en el cual se registran numerosos ensayos de identificación de filtros por cromatografía en capa fina y por HPLC (5).

Se realizó el test de linealidad con el filtro en tampón de fosfatos, pH 6, resultando un tiempo de retención (R_t) de 9,83 min.

Ensayo de cesión *in vitro*: se efectuaron dos series, de ensayos, con el filtro en tampón de fosfatos pH 6 y con la preparación en estudio, respectivamente, interponiendo membranas epidérmicas Sartorius para 500 ml de fase receptora también tamponada. La recogida de muestras se realizó durante 24 h, siendo detectada la cesión del filtro en la primera serie y no siendo detectado el paso de dicho filtro cuando se ensayó la emulsión múltiple (6).

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Si se observa el trayecto del agua en una situación de exposición solar y tras aplicar la preparación en la piel, se comprobará que, debido al calor, aumenta la sudoración y la difusión en sentido exógeno, mezclándose el agua corporal con la de la fase externa de la emulsión. El resultado demuestra una disminución de la viscosidad y, dependiendo del aumento de grado del agua, se crean condiciones para la inestabilidad más o menos rápida, excepto si no funciona algún mecanismo que pueda modificar dicha tendencia. Por otro lado, la evaporación se procesa a un ritmo dependiente de la temperatura y humedad ambientales, así como del poder de fijación del agua por parte de la emulsión. El gel hidrófilo empleado es el indicado, dada la adquisición de viscosidad causada por las uniones de solvatación de las moléculas poliméricas de metilcelulosa con el agua y por la existencia de micropartículas suspendidas de dióxido de titanio, lo que permite un equilibrio más duradero.

La fase acuosa más interna de la emulsión triple exige condiciones similares para mejorar la estabilidad de todo el sistema y también para poder actuar como reserva, en una segunda fase, después de que el sistema pierda la estructura inicial. Para el análisis de la elección de los hidratantes se toma como referencia una ecuación de Higuchi (1962) que, en los casos de sustancias disueltas en el vehículo, relaciona la cantidad de sustancia cedida (Q) por unidad de tiempo (t) con la concentración inicial (Co) y con su coeficiente de difusión en el vehículo (Dv) (6):

$$Q = 2C_0(D_v t / \pi)^{1/2}$$

La presencia de lactato y urea favorece la disminución de la pérdida de agua, una vez sumadas a las concentraciones de los compuestos fisiológicos excretados (aumento de Co y Dv), pudiéndose notar alguna tendencia para que sean permeables de nuevo, reteniendo el agua en el interior de las capas epidérmicas o minimizando el flujo hacia el exterior (efecto hidratante).

El filtro selectivo disuelto en la fase intermedia desarrolla su función cuando se mantiene en la superficie córnea y es importante que no alcance la epidermis viable. Aunque su coeficiente de difusión sea bastante elevado, se destaca que el sistema en estudio interpone el gel hidrófilo para el cual se intenta que el filtro no tenga afinidad.

Dada la tendencia para la conversión en emulsión simple O/A del vehículo propuesto, la fase oleosa no se escogió únicamente por el poder disolvente del filtro. El aceite mineral cumplía los requisitos de impermeabilidad al agua necesarios. Comparando las Figs. 1, 2 y 3, se verificó la resistencia en la cesión del filtro en la preparación propuesta, durante tiempo considerable en contacto con la membrana. Así pues, se minimiza cualquier posible reacción sensi-bilizante o fototóxica atribuida al filtro.

Fig. 1

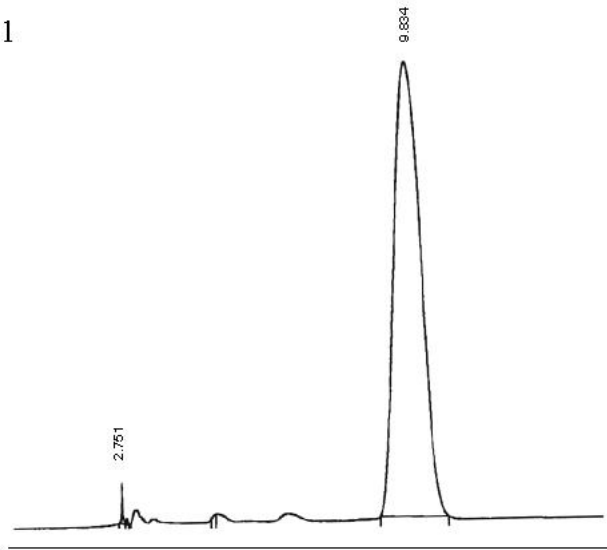


Fig. 1 – Cromatograma del filtro en tampón.

Fig. 2

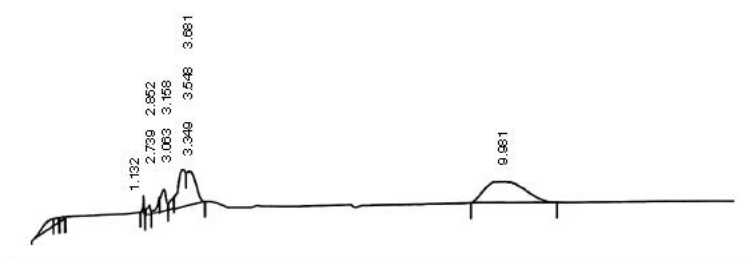
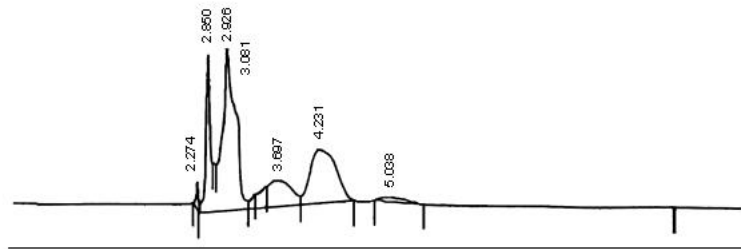


Fig. 2 – Cromatograma del filtro en tampón después de contacto con membrana epidérmica.

Fig. 3 – Cromatograma de la emulsión propuesta después de contacto con membrana epidérmica.

Fig. 3



Actualmente, en la Unión Europea no existe límite en la concentración de dióxido de titanio a emplear. Se sabe que la granulometría de este pigmento influye en la estabilidad del sistema heterogéneo y en la selectividad espectral, tal y como se demuestra en un artículo de autores ingleses (2). El dióxido de titanio orgánicamente no tratado es insoluble en agua y en aceite, pero las partículas menores de 3 μm tienen la posibilidad de penetrar a través de los folículos pilosos, a pesar que esa superficie represente únicamente un 0,1% de la superficie de la piel. Para asegurar la adsorción a la superficie cornea es conveniente modular la capacidad de adhesión del vehículo proporcionando un bajo coeficiente

de difusión. Según la igualdad de Einstein-Stocks ($D = RT/6\pi r\eta N$), la viscosidad y la difusión son inversamente proporcionales. En el presente caso, es importante la naturaleza de las fases (macromoléculas con retículo estable a variaciones de temperatura) e interfases (agentes no iónicos), así como la disolución de las micropartículas inorgánicas, que en conjunto determinan el comportamiento pseudoplástico de este sistema viscoelástico. Desde un punto de vista reológico, la previsión de estabilidad de dicho sistema viscoelástico no parece disminuir de forma rápida con el tiempo. Las Figs. 4 y 5 caracterizan el sistema y

Fig. 4

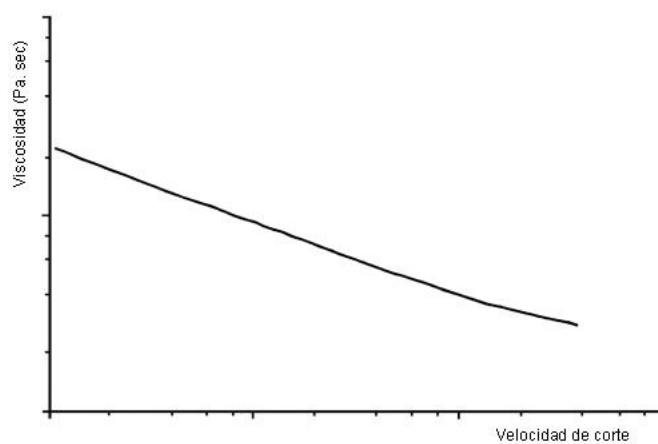
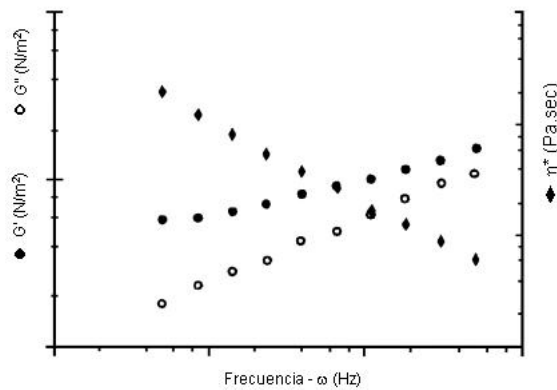


Fig. 4 – Comportamiento reológico de la emulsión múltipla.

Fig. 5

Fig. 5 – Ensayo oscilatorio: *moduli* (G' , G'') y vis-cosidad compleja *versus* frecuencia.

corresponden a lecturas efectuadas durante varias semanas después de la preparación, con perfiles análogos a los estudiados por otros autores (1). Al evaluar el HLB se constata que aún no siendo un valor elevado, se encuentra entre los límites requeridos para las emulsiones múltiples de este tipo.

Conclusiones

Con el objetivo de reforzar la epidermis frente a las radiaciones solares y de evitar la deshidratación se propone aquí:

Utilización de filtros solares asociados para anular o disminuir al máximo la intensidad de luz que atraviesa el producto aplicado.

Vehículo multifásico con poder de cesión para los compuestos hidratantes y con poder de retención de los filtros.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración a Mónica Fernández-Rodríguez y a Carlos De Diego Rus por la traducción del artículo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) SEMENZATO ET AL. (1994) *Intern. J. Cosm. Sci.* 16(6): 247-255.
- (2) JENIFER, L.R., SIMPSON, A., TUNSTALL, D. F. (1994) *Drug & Cosmetic Industry* 154(3): 32-39.
- (3) DROMGOOLE, S. Y MAIBACH, H. (1990) *Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects*. Marcel Dekker. New York.
- (4) FRENKEL, M., SHWARTZ, R. Y GARTI, N. (1983) *J. Coll. Interface Sci.* 94: 174-178.
- (5) MASS ET AL. (1991) *Intern. J. Cosm. Sci.*, 13: 303-315.
- (6) HIGUCHI, W.I. (1962) *J. Pharm. Sci.* 51: 802-804.

Influencia de los ácidos grasos de la dieta en la función inmunológica

M^aCARMEN OCHOA; OSCAR LAMAS; J. ALFREDO MARTÍNEZ Y AMELIA MARTI.

Departamento de Fisiología y Nutrición, Universidad de Navarra.

RESUMEN

La ingesta de n-3 PUFAs reduce notablemente la capacidad de respuesta del sistema inmune, ya sea inhibiendo la transcripción de proteínas involucradas en la función inmunológica (citoquinas, moléculas de adhesión, enzimas..), modificando la actividad de diversas enzimas (fosfolipasas, proteínquinas..) o modulando la producción de eicosanoides. Esta disminución de la respuesta inmunológica se manifiesta en una reducción de la actividad de las células del sistema inmune y de la producción de los mediadores químicos sintetizados por ellas (eicosanoides, citoquinas, moléculas de adhesión...).

La disminución de la actividad del sistema inmune puede ser beneficiosa en diversas patologías, pacientes que presenten desórdenes autoinmunes, alteraciones en la respuesta inflamatoria, alergias y ciertos tipos de cáncer. También es conveniente esta reducción de la capacidad de respuesta inmunológica en personas con órganos transplantados o injertos. El suplemento de la dieta de estos pacientes con aceite de pescado, una de las principales fuentes de n-3 PUFAs, puede atenuar sus complicaciones médicas.

Palabras clave: ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de las series 3 y 6 (n-3 y n-6).- Linfocitos.- Citoquinas.- Eicosanoides.

SUMMARY

Role of dietary fat on immune function

The intake of n-3 PUFAs notably reduced the degree of the immune response, by inhibiting the transcription of several proteins implicated in immune function (cytokines, adhesion molecules, enzymes), modifying the enzymatic activity (phospholipases, proteinkinases..) and also acting on eicosanoid production. The decreased immune response is associated with a lower activity of cells involved in the immune function and with the blockade of immune-cell mediators release (eicosanoids, cytokines, adhesion molecules..). A decrease in some of the immunological functions could be beneficial in patients with inflammatory diseases, allergies, cancer or autoimmune disorders. It may also be a convenient strategy for subjects having transplanted organs or autographs. Supplementing the diet of these patients with fish oil, rich in n-3 PUFAs, could contribute to improve their health status.

Key words: polyunsaturated fatty acids (PUFA n-3, n-6).- Lymphocytes.- Cytokines.- Eicosanoids.

INTRODUCCIÓN

Todos los mamíferos sintetizan ácidos grasos “de novo” mediante la condensación de moléculas de AcetilCoA, que una vez modificados por introducción de insaturaciones, son moléculas encargadas de mantener la estructura y función de las membranas plasmáticas. De esta manera se obtiene el ácido oléico (18:1, n-9) con 18 átomos de carbono y una insaturación en el carbono 9. Modificando el ácido oléico, las plantas sintetizan ácido linoléico (18:2, n-6) y ácido α -linolénico (18:3, n-3), ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de las series n-6 y n-3, respectivamente. Los mamíferos sin embargo, no disponen de los sistemas enzimáticos necesarios para transformar los ácidos grasos poliinsaturados de una serie en otra. (Fig 1)

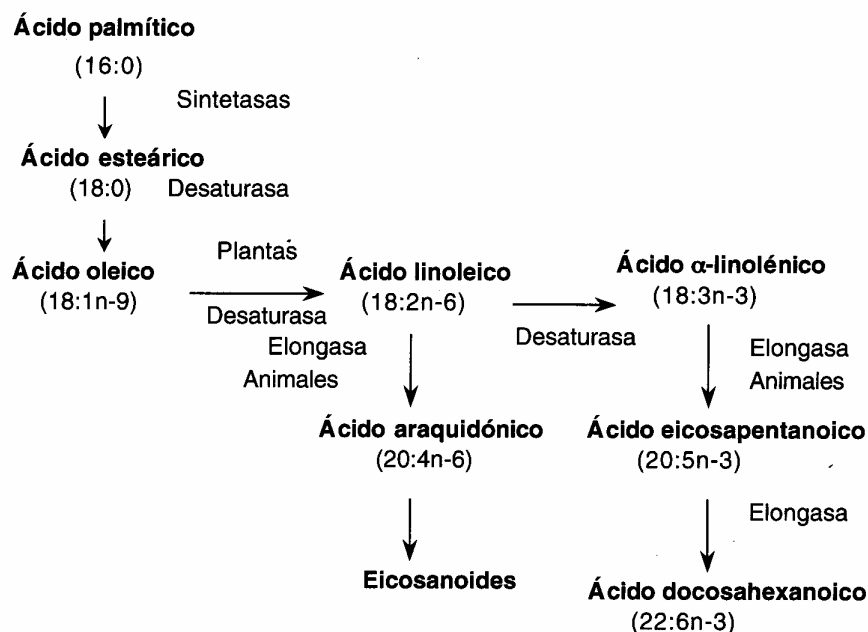


Figura 1. Biosíntesis de ácidos poliinsaturados a partir de los ácidos de la dieta.

El ácido linoléico es un componente de aceites vegetales utilizados en alimentación, como el aceite de maíz, azafrán y girasol. La célula animal metaboliza dicho ácido y lo transforma en ácido araquidónico, que es precursor de eicosanoides y otras moléculas. Los eicosanoides son un grupo de moléculas con propiedades proinflamatorias e inmunorreguladoras. Incluyen prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), y tromboxanos (TX) y pueden sintetizarse a partir de los ácidos araquidónico, dihomo- γ -linoléico y eicosapentanoico. El ácido eicosapentanoico inhibe competitivamente la síntesis de eicosanoides derivados del ácido araquidónico, por lo que la existencia de eicosanoides derivados de un precursor o de otro dependerá de la proporción en que estos se encuentren en la dieta¹.

Algas marinas unicelulares son capaces de transformar el ácido α -linoléico en ácido eicosapentanoico (20:5,n-3) y en ácido docosahexanoico (22:6,n-3). La transferencia de materiales que conlleva

la cadena alimentaria, explica que muchos aceites de pescado estén compuestos en un 40% por estos ácidos².

En la dieta Occidental predomina el ácido linoléico sobre el ácido eicosapentanoico así que los eicosanoides se sintetizan preferentemente a partir de ácido araquidónico. Por contraste, en Oriente se consume mayor cantidad de aceite de pescado (dieta más rica en ácido eicosapentanoico que linoléico) y se observa que esas poblaciones presentan una menor incidencia de enfermedades autoinmunes e inflamatorias³. Teniendo en cuenta que en esas personas la síntesis de eicosanoides se da mayoritariamente a partir de ácido eicosanoico, parece lógico suponer una relación entre los precursores de los eicosanoides y sus posteriores funciones.

EFFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

La proliferación de linfocitos B y T, aislados del bazo, estimulada por mitógenos (concanavalina A, lipopolisacárido...) es notablemente menor en animales de laboratorio alimentados con aceite de pescado que aquellos que consumen dietas basadas en manteca de cerdo, aceite de maíz, coco, azafrán o linaza⁴. Este efecto también se ha observado en linfocitos aislados de ganglios linfáticos de ratones⁵. Además, se ha demostrado que los ácidos eicosapentanoico y docosahexanoico parecen ser equipotentes en su capacidad de reducir la proliferación celular⁶.

Por otro lado, la actividad de las células NK (asesinas naturales) es menor en ratas alimentadas con dietas ricas en grasas que en las alimentadas con dieta de escaso contenido lipídico. No obstante, cuando grupos de ratas son alimentadas con grasas diversas (aceite hidrogenado de coco, aceite de oliva, de azafrán o de pescado), las que presentan células NK con menor actividad son las del grupo alimentado con aceite de pescado⁷.

En sujetos humanos se demuestra que los que poseen un alto porcentaje de grasa corporal presentan menor actividad en sus linfocitos periféricos y células NK comparado con los de porcentaje de grasa

corporal normal⁸. Además, los n-3 PUFAs afectan considerablemente a la actividad de las células NK, así una inyección intravenosa de ácido eicosapentanoico en sujetos sanos anula la respuesta de las mismas durante 24 horas⁹.

La suplementación de la dieta con n-3 PUFAs modifica la actividad de los neutrófilos, disminuyendo su capacidad para la quimiotaxis y para la síntesis de LTB₄ (leucotrienos de la serie cuatro) y otros derivados del ácido araquidónico. La actividad inflamatoria de neutrófilos y monocitos es estimulada por mediadores derivados del ácido araquidónico, por lo que la disminución de su síntesis supone una menor actividad inflamatoria. La presencia de n-3 PUFAs en cultivos de monocitos humanos disminuye la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHCII) y de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1 y LFA-1), lo que sugiere una disminución en la capacidad de estas células para presentar antígenos a los linfocitos T y para la actividad quimiotáctica.

Los monocitos y neutrófilos están involucrados en la patogenia de la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias crónicas. El aporte de una cantidad extra de n-3 PUFAs en la dieta de estos pacientes consigue mejorar algunos parámetros inmunológicos y bioquímicos patológicos, además de disminuir la rigidez matinal de las articulaciones.

INFLUENCIA DE LOS N-3 PUFAS EN LAS INTERACCIONES ENTRE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

La interacción entre células del sistema inmune tiene lugar mediante la síntesis de mediadores químicos (eicosanoides, óxido nítrico:NO, citoquinas, ..) y por el contacto directo célula-célula mediado por moléculas de adhesión. Los n-3 PUFAs influyen en estos procesos de comunicación intercelular.

Las células del sistema inmune son una fuente de eicosanoides, pero a la vez están reguladas por ellos¹⁰. Así, las prostaglandinas y los leucotrienos están implicadas en la regulación de la intensidad y duración de las respuestas inflamatoria e inmune. La prostaglandina E₂ (PGE₂) tiene efectos proinflamatorios, como la inducción de la fiebre y del

eritema, la vasodilatación y el aumento de: la permeabilidad vascular, del dolor y del edema. Los leucotrienos de la serie 4 (LTB₄) y la PGE₂ regulan también la producción de citoquinas por macrófagos, linfocitos y monocitos¹¹ de forma que en condiciones de infección o inflamación crónica aumentan su síntesis.

La producción de citoquinas parece estar regulada por eicosanoides, aunque los resultados obtenidos en cultivos celulares *ex vivo* son algo contradictorios. En algunos trabajos se ha encontrado que la producción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleuquinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) parece depender más de las condiciones del cultivo celular que de la presencia de n-3 PUFAs¹¹⁻¹⁹. Los ensayos realizados con animales demuestran, sin embargo, que los n-3 PUFAs disminuyen la producción de TNF- α de células polimorfonucleares de la sangre periférica (PBMC)¹⁶ y causan un aumento de los niveles de TNF- α circulante en ratones alimentados con aceite de pescado¹³.

Los n-3 PUFAs disminuyen significativamente la síntesis *ex vivo* de IL-1 α , IL-1 β y TNF- α en PBMC aislados de individuos sanos y de pacientes con diversas afecciones: artritis reumatoide²⁰, enfermedades inflamatorias en piel²¹, diabetes tipo 1²² y esclerosis múltiple²³. La producción de estas citoquinas puede quedar suprimida hasta 10 semanas después de haber terminado la suplementación, por lo que parece que es necesario un periodo de tiempo para metabolizar el aceite de pescado. Otros estudios indican que los n-3 PUFAs reducen la producción de citoquinas en individuos jóvenes (20-33 años) y mayores (51-68 años)²⁴.

La producción de TNF- α , IL-1 e IL-6 es también inhibida por la PGE₂²⁵. Además, como los n-3 PUFAs disminuyen la producción de PGE₂ parece lógico suponer que los n-3 PUFAs modifican los niveles de TNF- α , IL-1 e IL-6 a través de este mecanismo. Por otro lado, los LTB₄ aumentan los niveles de TNF- α , IL-1 e IL-6²⁶ y la alimentación con n-3 PUFAs produce una disminución de la producción de LTB₄²⁷, por lo que se puede deducir que los efectos de los n-3 PUFAs sobre la producción de citoquinas pueden estar relacionados con el balance entre la producción de PGE₂ y la producción de LTB₄.

Las moléculas de adhesión actúan en muchas interacciones entre células. La interacción entre linfocitos T y las células presentadoras de antígenos está mediada por pares ligando-receptor: *Cluster of differentiation* (CD)11a y CD18-CD54, CD11a y CD18-CD102 y CD2-CD58²⁸⁻³⁰. Para una buena respuesta inmune es necesario un apropiado nivel de expresión de estas moléculas en los linfocitos T. Además, la adhesión de leucocitos al endotelio está mediada por numerosos pares ligando-receptor: CD11a y CD18-CD54, CD54-CD11a y CD18, CD49d y CD29-CD106, CD2-CD58, CD62L-MAcCAM-1 (molécula de adhesión celular de la mucosa) y CD44-hialuronato. El movimiento de leucocitos entre los distintos compartimentos del cuerpo, dentro y fuera de los órganos linfoides y en los lugares donde tiene lugar la respuesta inmune e inflamatoria requiere la expresión de estas moléculas de adhesión, que parece estar relacionada con algunos procesos agudos y crónicos de enfermedades inflamatorias.

Los macrófagos del peritoneo tratados con tioglicolato cuando se cultivan en medios ricos en n-3 PUFAs se adhieren menos a las superficies artificiales. Esta adhesión está mediada por las moléculas CD11a y CD18, lo que sugiere que el ácido eicosapentanóico y el docosahexanóico disminuyen la síntesis de una de las dos moléculas, o de las dos³¹. La adhesión de células endoteliales y monocitos está mediada por CD106, CD62E y CD54 y esta adhesión también se ve disminuída por la presencia de n-3 PUFAs³². Además, se sabe que al añadir ácido eicosapentanóico y ácido docosahexanóico al medio de cultivo de células procedentes de la vena umbilical humana, estimuladas con LPS o con citoquinas, disminuye la capacidad de adhesión de los linfocitos de la sangre periférica. Todos estos datos indican que los n-3 PUFAs disminuyen la expresión de moléculas de adhesión en macrófagos, linfocitos, monocitos y células endoteliales, lo que representa que los n-3 PUFAs de la dieta influyen en el movimiento de linfocitos y monocitos entre los compartimentos del cuerpo humano.

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS N-3 PUFAS

Parece que la influencia de los n-3 PUFAs sobre la actividad de las células del sistema inmune está demostrada, aunque hay controversia sobre su efecto y mecanismo. Estos ácidos grasos alteran la producción de mediadores que influyen en la comunicación entre células del sistema inmune (eicosanoides, citoquinas, óxido nítrico...) y alteran la producción de moléculas de adhesión. La acción de los n-3 PUFAs sobre los eicosanoides puede explicar parcialmente sus efectos sobre el sistema inmune, pero muchos de los efectos observados no tienen relación con los eicosanoides, por lo que debemos considerar la existencia de otro mecanismo de acción de los n-3 PUFAs sobre las células del sistema inmune. Este mecanismo podría basarse en la regulación de los genes relacionados con el funcionamiento de las células del sistema inmune (ver figura 2).

Figura 2

Los ácidos grasos parecen afectar a genes relacionados con su metabolismo, con el metabolismo de las lipoproteínas del hígado y a genes relacionados con la diferenciación y el desarrollo de los adipocitos³²⁻³⁶. Los n-3 PUFAs de la dieta presentan efectos particularmente potentes sobre la expresión de genes relacionadas con la proliferación de peroxisomas hepáticos, con la oxidación de ácidos grasos y con la formación de las lipoproteínas. Sin embargo, son todavía escasos los estudios sobre la influencia de los ácidos grasos en la expresión de genes propios de las células del sistema inmune.

La inclusión de aceite de pescado en la dieta de ratones propensos a enfermedades autoinmunes aumenta los niveles de mRNA de la interleuquina-2 (IL-2), IL-4 y del factor β de crecimiento tumoral (TGF- β) mientras que disminuyen los niveles de mRNA del c-myc y del c-ras³⁷. La dieta rica en n-3 PUFAs también disminuye los niveles de mRNA de la IL-1 β , IL-6 y TNF- α . La transducción de señales a través de receptores de membrana también parece estar influida por los n-3 PUFAs, ya que la incubación de células endoteliales con ácido docosahexanóico produce una reducción de los niveles de mRNA de CD106.

Los macrófagos de peritoneo activados con tioglicolato y cultivados en presencia de ácido docosahexanóico disminuyen su producción de NO en respuesta a lipopolisacárido (LPS) e interferon- γ ; (la disminución es proporcional a la concentración de ácido docosahexanóico). La baja producción de NO es debida a la disminución de los niveles de mRNA de la enzima formadora, óxido nítrico sintasa³⁸.

MODIFICACIONES DE LA EXPRESIÓN DE GENES POR LOS N-3 PUFAS

Un mecanismo por el que los n-3 PUFAs pueden influir en la expresión de genes es modificando la cascada de señales desencadenada por la unión de un ligando a su receptor de membrana lo que conduce finalmente a la activación de los factores de transcripción (TF). Así, los n-3 PUFAs (y todos los PUFAs en general) se pueden unir directamente a los factores de transcripción y alterar así su actividad.

Algunos fosfolípidos tienen la función de activar o estabilizar enzimas relacionados con la señalización intracelular, como la fosfatidilserina que es necesaria para la activación de la PKC (proteín quinasa C). El diacilglicerol (DAG) activa algunas formas de PKC y otros enzimas formadores de segundos mensajeros. Es probable que cambiando el tipo de ácido graso presente se modifique la estructura del fosfolípido y sus propiedades de manera que afecte a la transducción de la señal. El tipo de fosfolípido presente en las membranas de linfocitos³⁹ y macrófagos⁴⁰ varía según la composición lipídica de la dieta. Así, los linfocitos de ratones alimentados con ésteres de ácido eicosapentanóico y ácido docosahexanóico y estimulados con concanavalina A (Con A) producen menos DAG que los linfocitos de ratones alimentados con aceite de azafrán⁴¹. Además los n-3 PUFAs producen la supresión de la generación de ceramidas en linfocitos estimulados con Con A⁴². De estos estudios se puede deducir que los n-3 PUFAs afectan de alguna manera a la actividad de una o más fosfolipasas responsables de la producción de segundos mensajeros⁴⁰.

Una dieta con alta concentración de n-3 PUFAs no afecta a los niveles de fosfolipasa C γ de linfocitos de rata, pero disminuye significativamente su actividad. La fosfolipasa C γ es activada por una o más tirosina-quinasa, lo que sugiere que el aceite de pescado afecta a las mismas. Las tirosinquinasa están asociadas a la membrana plasmática. Esta asociación requiere una cierta composición de fosfolípidos o unas determinadas propiedades físicas en la membrana, que pueden ser alteradas por la incorporación de n-3 PUFAs y así se puede impedir la actividad óptima de las enzimas.

Diversos estudios *in vitro* demuestran que la actividad de la PKC aumenta por la influencia del ácido docosahexanóico, lo que parece indicar que los ácidos grasos pueden alterar *per se* algunas vías de señalización intracelular⁴³. El ácido eicosapentanóico y el ácido docosahexanóico aumentan la actividad de la PKC del cerebro en ausencia de fosfatidilserina y DAG, mientras que en presencia de fosfatidilserina y de DAG se inhibe la actividad de la PKC un 60%⁴⁴, pero la actividad queda totalmente inhibida si además de fosfatidilserina y DAG hay calcio en el medio⁴⁵. Un cambio en la concentración de calcio puede afectar seriamente a las vías de señalización intracelular que estimulan a linfocitos, macrófagos y otras células a través de citoquinas, factores de crecimiento y antígenos. Además hay evidencia de que los ácidos grasos libres inciden en los cambios en la concentración de calcio. Algunos ácidos grasos insaturados (ácido α -linolénico, eicosapentanóico y docosahexanóico) inhiben la síntesis de anti-CD3 incrementando la concentración intracelular de calcio en células T⁴⁶. Los ácidos grasos parecen actuar por un doble mecanismo: bloqueando los canales de calcio e impidiendo así su entrada a la célula y modificando la síntesis de segundos mensajeros.

Otra posible forma de acción de los ácidos grasos de la dieta sobre el sistema inmune puede estar basada en la influencia que estos tienen sobre los factores de transcripción. El factor de transcripción NF kappa B (NF- κ B) regula la síntesis de ciertas citoquinas (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α), de receptores de citoquinas (IL-2R), de moléculas de adhesión (CD54, CD62, CD 106) y de enzimas que sintetizan mediadores como la óxido nítrico sintasa. El NF- κ B es activado mediante la fosforilación de una de

sus subunidades. Esta fosforilación es llevada a cabo por la PKC. Los n-3 PUFAs pueden disminuir la actividad de algunas isoformas de PKC (por el mecanismo antes descrito) por lo que inhiben la activación del NF- κ B y así se puede suprimir la expresión de numerosos genes relacionados con el sistema inmune. Las ceramidas también pueden activar el NF- κ B independientemente de la actividad de la PKC. Los n-3 PUFAs disminuyen la producción de ceramidas, así por esta vía también reducen la expresión de mediadores de la respuesta inmune.

POSIBILIDADES TERAPEÚTICAS

Los efectos de los ácidos grasos de la dieta en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en la tolerancia oral han sido ampliamente estudiados en animales⁴⁷. Los ratones alimentados con dietas ricas en ácido α -linolénico presentan menos síntomas clínicos de ciertas alergias experimentales. Los ratones que reciben ovoalbúmina y después dietas ricas en n-3 PUFAs o en ácido α -linolénico tienen disminuida la respuesta de proliferación de linfocitos del bazo. Esto sugiere que los PUFAs de la dieta influyen en la tolerancia oral y modifican la reacción inmune tanto en la respuesta Th (T *helper*) tipo 1 como en la tipo 2.

En algunos trabajos se ha mostrado el efecto beneficioso del aceite de pescado en pacientes con enfermedades inflamatorias y con artritis reumatoide⁴⁸. Se ha observado que los pacientes con cáncer de páncreas presentan elevados los niveles de citoquinas proinflamatorias, lo que aumenta su gasto metabólico. Así, algunos de estos pacientes que habían perdido 2 kg de peso en un mes cuando fueron suplementados con ácido eicosapentanoico (6 g/día) durante 4 semanas lograron estabilizar el peso corporal e incluso recuperar su peso inicial⁴⁹.

Los n-3 PUFAs pueden tener un gran papel en la supervivencia de los injertos. Se ha realizado un estudio con animales sometidos a un trasplante de corazón, comparando el tiempo de supervivencia de los animales según, se le administraron lípidos por perfusión o una solución salina después de la operación. Los animales con perfusión salina

vivieron ocho días después del trasplante, mientras que aquellos que recibieron una perfusión con n-3 PUFAs, la supervivencia fue de diez días y los que recibieron aceite de pescado vivieron trece días. También se han obtenido resultados favorables cuando se ha suplementado la dieta de individuos con trasplante de riñón con aceite de pescado. En concreto, la combinación de aceite de pescado con las terapias tradicionales de inmunosupresión ha producido una considerable reducción del rechazo de este órgano⁵⁰.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Yaqoob P, Calder P. C. Effects of dietary lipids manipulation upon inflammatory mediators production by murine macrophages. *Cell Immunol* 1995; 163:120-128.
- (2) Miles E. A., Calder P.C. Modulation of immune function by dietary fatty acids. *P Nutr Soc* 1998; 57:277-292.
- (3) Calder P. C. Fat chance of immunomodulation. *Immunol Today* 1998; 19:244-247.
- (4) Alexander N. J., Smythe N.L. Dietary modulation of in vitro lymphocyte function. *Ann Nutr Metab* 1988; 32:192-199
- (5) Lim B. O., Jolly C. A., Zaman K, Fernandes G. Dietary (n-6) and (n-3) fatty acids and energy restriction modulate mesenteric lymph node lymphocyte function in autoimmune-prone (NZB x NZW) F1 mice. *J Nutr* 2000; 130: 1657-1664.
- (6) Jolly C. A., Jiang Y-H, Chapkin R. S., McMurray D. N. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion and the formation of diacylglycerol and ceramide. *J Nutr* 1997; 127:37-43
- (7) Yaqoob P, Newsholme E. A., Calder P. C. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol Lett* 1994; 41:241-247
- (8) Martí A, Martínez A. Obesidad y función inmunológica. *Nutrición y Obesidad* 2001; 3:186-193
- (9) Jeffery N. M., Sanderson P, Sherrington E. J., Newsholme E. A., Calder P.C. The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. *Lipids* 1996; 31:737-745.
- (10) Hwang D. Essential fatty acids and the immune response. *Faseb J* 1989; 3:2052-2061.
- (11) Rola-Pleszczynski M, Stankova J. Cytokine gene regulation by PGE₂, LTB₄ and PAF. *Mediat Inflamm* 1992; 1:5-8.
- (12) Turek J. J., Schoenlein I. A., Bottoms G. D. The effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on tumor necrosis factor- α production and leucine aminopeptidase levels in rat peritoneal macrophages. *Prostag Leukotr Ess* 1991; 43:141-149.
- (13) Watanabe S, Hayashi H, Onozaki K, Okuyama H. Effect of dietary α -linolenate/linoleate balance of lipopolysaccharide-induced tumor

- necrosis factor production in mouse macrophages. *Life Sci* 1991; 48:2013-2020.
- (14) Renier G, Skamene E, de Sanctis J, Radzioch D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice: Modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:1515-1524.
- (15) Hubbard N. E., Chapkin R. S., Erickson K. L. effect of dietary liseed oil on tumoricidal activity and eicosanoid production in murine macrophages. *Lipids* 1994; 29:651-655.
- (16) Somers S. D., Erickson K. L. Alteration of tumor necrosis factor- α production by macrophages from mice fed diet high in eicosapentanoic and docosahexanoic acids. *Cell Immunol* 1994; 153:287-297.
- (17) Billiar T, Bankey P, Svingen B et. al. Fatty acids uptake and Kupffer cell function: fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin simulation. *Surgery* 1988; 104:343-349.
- (18) Wallace F. A., Neely S. J., Miles E. A., Calder P.C. Dietary fish oil decreases the production of pro-inflammatory mediators by murine macrophages. *P Nutr Soc* 1998; 57:50A.
- (19) Lokesh B. R., Sayers T. J., Kinsella J. E. Interleukin-1 and tumor necrosis factor synthesis by mouse peritoneal macrophages is enhanced by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Immunol Lett* 1990; 23:281-286.
- (20) Lee T. H., Hoover R. L., Williams J. D. et al. Effects of dietary enrichment with EPA and DHA on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *New Engl J Med* 1985; 312:1217-1224.
- (21) Kremer J. M., Lawrence D. A., Jubiz W et al. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patiens with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1990; 33:810-820.
- (22) Soyland E, Lea T, Sandstad B, Drevon A. Dietary supplementation with very long chain n-3 fatty acids in man decreases expression of the interleukin-2 receptor (CD25) on mitogen-stimulated lymphocytes from petiens with inflammatory skin diseases. *Eur J Clin Invest.* 1994; 24:236-242.
- (23) Endres S, Ghorbani R, Kelley V. E. et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *New Engl J Med.* 1989; 320:265-271.
- (24) Gallay V, Sarchielli P, Trequattrini A et al. Cytokine secretion and eicosanoid production in the peripheral blood mononuclearcells of MS patiens undergoing dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neuroimmunol.* 1993; 56:143-153.

- (25) Grimm H, Tibell A, Norrind b, Blecher C, Wilker S, Schwemmel K. Immunoregulation by parenteral lipids: impact of the n-3 to n-6 fatty acids ratio. *J. Parent Enter Nutr* 1994; 18:417-421.
- (26) Eendres S, Fulle H. J., Sinha B et al. Cyclic nucleotides differentially regulate the synthesis of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear cells. *Immunology* 1991; 72:56-60.
- (27) Schade U. F., Ernst M, Reinke M, Wolter D. T. Lipoxygenase inhibitors suppress formation of tumor necrosis factor in vitro and in vivo. *Biochem Bioph Res Comm* 1989; 159:748-754.
- (28) Meydani S. M., Endres S, Woods M. M. et al. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr*. 1991; 121:547-555.
- (29) Stoolman L. M. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 1989; 56:907-910.
- (30) Springer T. A. Adhesion receptors of immune system. *Nature* 1990; 346:425-433.
- (31) Hogg N, Landis R. C. Adhesion molecules in cell interactions. *Curr Opin Immunol* 1993; 5:383-390.
- (32) Faull R. J. Adhesion molecules in health and disease. *Aust Nz J Med* 1995; 25:720-730.
- (33) Calder P. C., Bond J. A., Harvey D. J., Gordon S, Newsholme E. A. Uptake of saturated and unsaturated fatty acids into macrophages lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochem J* 1990; 269:807-814.
- (34) Sanderson P, Yaqoob P, Calder P. C. Effects of dietary lipid manipulation upon graft vs. host and host vs. graft responses in the rat. *Cell immunol* 1995; 164: 240-247.
- (35) Jump D. B., Ren B, Clarke S, Thelen A. Effects of fatty acids on hepatic gene expression. *Prostag Leukotr Ess* 1995; 48:107-111.
- (36) Ailhaud G, Amri E-Z, Grimaldi P-A. Fatty acids and adipose cell differentiation. *Prostag Leukotr Ess* 1995; 48:113-115.
- (37) Berthou L, Saladin R, Yaqoob P. Regulation of rat liver apolipoprotein A-I, apolipoprotein A-II and acil CoA oxidase gene expression by fibrates and dietary fatty acids. *Eur J Biochem* 1995; 232:179-187.
- (38) Fernandes G, Bysani C, Venkatraman J. T., Tomar V, Zhao W. Increased TGF- β and decreased oncogene expression by n-3 fatty acids in the spleen delays onset of auto-immune disease in B/W mice. *J Immunol* 1994; 152:5979-5987.

- (39) Khair-El-Din T, Sicher S. C., Vazquez M. A., Chung G. W., Stallworth K. A., Kitamura K, Miller R. T. Transcription of the murine iNOS gene is inhibited by docosahexanoic acid, a major constituent of fetal and neonatal sera as well as fish oils. *J Exp Med* 1996; 183:1241-1246.
- (40) Huang S-C, Fritsche K. L. Alteration in mouse splenic phospholipid fatty acid composition and lymphoid cell populations by dietary fat. *Lipids* 1992; 27:25-32.
- (41) Marignani P. A., Sebaldt R. J. Formation of second messenger diacylglycerol in murine peritoneal macrophages is altered after in vivo (n-3) polyunsaturated fatty acid supplementation. *J Nutr* 1995; 125:3030-3040.
- (42) Fowler K. H., Chapkin R. S., McMurray D. N. Effects of purified dietary n-3 ethyl esters on murine T lymphocyte function. *J Immunol.* 1993; 151:5186-5197.
- (43) Sumida C, Graber R, Nunez E. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostag Leukotr Ess* 1993; 48:117-122.
- (44) Speizer L. A., Watson M. J., Brunton L. L. Differential effects of omega-3 fish oils on protein kinase activities in vitro. *Am J Physiol* 1991; 261:E109-E114.
- (45) May C. L., Southworth A. J., Calder P. C. Inhibition of lymphocyte protein kinase C by unsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 195:823-828.
- (46) Peck M. D., Spalding P. B., Moffat F. L., Han T, Jy W. Dietary olive oil enhances murine lymphocyte calcium uptake. *J Trauma* 2000; 49: 109- 114.
- (47) Harbige L. S., Yeatman N, Amor S, Crawford M. A. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by a novel fungal source of gamma-linolenic acid. *Br J Nutr* 1995; 74:701-715.
- (48) Calder P.C. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proc Nutr Soc* 1996; 55:737-774.
- (49) Wigmore S. J., Fearon K. C. H. Maingay J. P. Ross J. A. Down-regulation of the acute-phase response in patients with pancreatic cancer cachexia receiving oral eicosapentaenoic acid is mediated via suppression in interleukin-6. *Clin Sci* 1997; 92:215-221.
- (50) Grimm H, Tibell A, Norrlind B, Schott J, Bohle R. M. Nutrition and allograft rejection impact of lipids. *Transplant Immunol* 1995; 3:62-67.



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

www.ranf.com