



ISSN: 1697-090X

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2004;2:1-78

Mayo - Agosto 2004 / May - August 2004

[Inicio](#)  
[Home](#)

[Comité Editorial](#)  
[Editorial Board](#)

[Comité Científico](#)  
[Scientific Committee](#)

[Normas para los autores](#)  
[Instruction to Authors](#)

[Derechos de autor /](#)  
[Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)

## EDITORIAL

### [2-4.- AMINOGLYCOSIDES AND NEPHROPATHY / AMINOGLUCÓSIDOS Y NEFROTOXICIDAD](#)

Carlos Guido Musso. Nephrology. Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina

## ORIGINALS / ORIGINALES

### [5-12.- VALIDACION DE LA DOSIS DE DIALISIS MEDIDA CON ONLINE CLEARANCE MONITOR \(OCM\) Y EL Kt/V DE DAUGIRDAS 93. UTILIZACION DE LA ENFERMERIA NEFROLOGICA EN LA PRACTICA DIARIA EN UNA UNIDAD DE HEMODIALISIS.](#)

Cigarrán S, Coronel F, Torrente J, Rodríguez Cabrera MJ, Torres Márquez ML, Brunete Mayor E, Fernández-Palacios Ruiz V, García-Mauriño Mundi C, Lorenzo Ponce C. Unidad Nefrológica Moncloa. Fresenius Medical Care (FMC). Madrid. España

### [13-35.- A NANOSCALE POLYNUCLEOTIDE-NEUTRAL LIPOSOME SELF-ASSEMBLIES FORMULATED FOR THERAPEUTIC GENE DELIVERY](#)

Süleymano•lu E. Department of Physical Chemistry of Drugs, Faculty of Pharmacy, Biophysics Section, and The Slovak Academy of Sciences, Institute of Experimental Physics, Department of Biophysics, Košice, The Slovak Republic

### [36-45.- MEDICINA, CIENCIA Y MEDICINA BASADA EN LA EVIDENCIA](#)

Díaz-Alersí R. Servicio de Medicina Intensiva. Hospital Puerto Real. Cádiz. España

## CASE REPORTS / CASOS CLÍNICOS

### [46-55.- CARCINOMA ODONTOGÉNICO DE CELULAS CLARAS. ESTUDIO CLÍNICO, RADIOLÓGICO Y PATOLÓGICO DE UN CASO.](#)

Falcón-Escobedo R, Rodríguez Flores R. Facultad de Medicina, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Hospital de Nuestra Señora de la Salud e Instituto Mexicano del Seguro Social. San Luis Potosí. México

### [56-64.- SINERGISMO FARMACODINÁMICO.A PROPÓSITO DE UN CASO INTERVENIDO QUIRÚRGICAMENTE DE URGENCIA BAJO ANESTESIA GENERAL.](#)

Calzado Marten E, López Rodríguez MS, Triana Falcon M, Pallares Villarreal Y. Hospital Joaquín Albarrán, ISCMH Facultad Finlay Albarrán y Clínica Central Cira García Reyes. Ciudad Habana, Cuba

### [65-68.- ACUTE RENAL FAILURE WITH NORMAL PLASMA UREA LEVELS: A MARKER OF PROXIMAL TUBULAR DYSFUNCTION WITH DIABETES INSIPIDUS](#)

### [69-73.- INSUFICIENCIA RENAL AGUDA CON UREA PLASMÁTICA NORMAL: UN MARCADOR DE DISFUNCIÓN TUBULAR PROXIMAL Y DIABETES INSÍPIDA.](#)

Musso CG, Giordani C, Stonski E, Peralta M, Bonetto A, Jauregui R, Algranati L. Nephrology Department & Centro Agustin Rocca. Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina

## INTERNET REVIEWS / REVISIONES EN INTERNET

### [74-78.- UTILIDAD CLÍNICA DE LA VIDEOCONFERENCIA EN TELEMEDICINA](#)

Coma del Corral MJ, Díez Sánchez V, Hernandez Martín A, Gutierrez Ortega MC, Ramirez Herrera M. Unidad de Investigación y Dermatología. Hospital General Yagüe. Burgos. España



ISSN: 1697-090X

[Inicio](#)  
[Home](#)

[Índice del volumen](#)  
[Volume index](#)

[Comité Editorial](#)  
[Editorial Board](#)

[Comité Científico](#)  
[Scientific Committee](#)

[Normas para los autores](#)  
[Instruction to Authors](#)

[Derechos de autor](#)  
[Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)



Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2004;2:2-4.

## Editorial: AMINOGLYCOSIDES AND NEPHROPATHY

Despite nephrotoxicity complicates 10 to 20 percent of therapeutic courses based on aminoglycosides these drugs maintain a leading role in bactericidal therapy of severe Gram negative infections<sup>1</sup>.

Aminoglycosides are cationic molecules that undergo renal excretion by glomerular filtration, although a small percentage of the filtered drug is reabsorbed proximally<sup>2</sup>. It has been suggested that the aminoglycosides bind to specific receptors and undergo endocytosis via the same mechanism used by amino acids and small peptides in the cells lining the S1 and S2 portions of the proximal convoluted tubules<sup>3</sup>. These vesicles fuse with lysosome membranes where many enzymes are inhibited into these organelles. As a consequence cellular membranes, that are normally degraded inside these vesicles, accumulate as myeloid bodies. The progression of this phenomenon leads to lysosomal membrane disruption, allowing many enzymes to reach the cytoplasm<sup>2, 3</sup>.

Described factors that increase severity of aminoglycoside-induced renal injury are: advanced age, prolonged exposure and increased frequency to this drug, more toxic aminoglycoside, concomitant exposure to other nephrotoxic drugs, volume contraction, acidosis, magnesium, calcium and potassium depletion, preexisting hepatic disease or nephropathy (specially if dose is not adjusted to level of renal function)<sup>3, 4</sup>. On the other hand factors postulated as renal protective are: potassium supplements, urinary alcalinitation, high calcium diets, and use of polymers of aspartic acid, calcium antagonist, carbenicilin and ticarcilin<sup>2</sup>.

The following are the four aminoglycoside-induced renal syndromes that may appear as isolated or combined entities:

1. Acute renal failure: aminoglycoside-induced acute renal failure generally appears after 7 days of exposure and its urinary pattern is usually a non-oligoanuric one. High urinary enzyme levels usually is one of the earliest sign of nephrotoxicity. Alanin-aminopeptidase, N-acetil-beta-D-glucosaminidase and gammaglutamiltransferase are the discharged enzymes<sup>2</sup>. Urinalysis usually shows proteinuria and hyaline and granular casts<sup>1, 4, 5</sup>). When acute renal failure develops in the course of aminoglycoside therapy, antibiotic withdrawal and replacement with non-aminoglycoside agent is prudent. Recovery of renal function generally occurs if renal failure is recognized early and the offending agent is discontinued<sup>4</sup>. Prolonged therapy have led to irreversible damage and dialysis dependence<sup>1</sup>. Neomicin is the most nephrotoxic aminoglycoside while streptomycin is the least one<sup>4</sup>.
2. Fanconi syndrome and tubular electrolyte wasting: aminoglycoside-induced renal tubular toxicity include from an isolated tubular wasting of amino acids, glucose, potassium, calcium, magnesium or/and phosphorus to a complete Fanconi syndrome. These wasting syndromes can occur in the absence of renal failure and they even appear before the instalation of acute tubular necrosis<sup>2, 6, 7</sup>).
3. Diabetes insipidus: aminoglycoside can induced water diuresis due to an inability to concentrate urine because of a reduction of the epythelial sensitivity to antidiuretic hormone through an adenilciclyse inhibition<sup>2, 8</sup>).
4. Hypercloremic metabolic acidosis: due to a reduction in the renal capability to proton excretion and amonium generation<sup>2</sup>.

In conclusion aminoglycosides are useful antibiotics but they have to be used cautiously because of

their nephrotoxicity. Four are the aminoglycoside-induced renal syndromes: acute renal failure, partial or complete Fanconi syndrome, diabetes insipidus and tubular acidosis. Recovery of renal function generally occurs if renal failure is recognized early and the offending agent is discontinued.

---

## Editorial: AMINOGLUCÓSIDOS Y NEFROTOXICIDAD

Si bien del 10-20 % de los tratamientos basados en los aminoglucósidos pueden acarrear nefrotoxicidad, estos antibióticos bactericidas siguen liderando los esquemas terapéuticos contra severas infecciones a gérmenes Gram negativos<sup>1</sup>.

Los aminoglucósidos son moléculas catiónicas eliminadas por filtración glomerular, aunque un pequeño porcentaje filtrado es reabsorbido a nivel de los túbulos proximales<sup>2</sup>. Se ha sugerido que los aminoglucósidos se unen a receptores específicos y luego son incorporados a las células tubulares por endocitosis a través del mismo mecanismo que reabsorben aminoácidos y pequeños péptidos en las células que tapizan el S1 y S2 de los túbulos contorneados proximales<sup>3</sup>. Estas vesículas se fusionan con lisosomas donde muchas enzimas son inhibidas dentro de estas organelas. Como consecuencia las membranas celulares, que normalmente son degradadas dentro de estas vesículas, se acumulan conformando los llamados cuerpos mieloides. La progresión de este fenómeno lleva a la disrupción de los lisosomas permitiendo la salida de sus enzimas al citoplasma<sup>2, 3</sup>.

Los factores descritos como facilitadores del daño renal por aminoglucósidos son: edad avanzada, exposición prolongada o en alta frecuencia a estas drogas, uso de las formas más nefrotóxicas, exposición concomitante a otros nefrotóxicos, contracción de volumen, acidosis, depleción de magnesio, potasio y/o calcio, hepatopatía o nefropatía preexistente (sobre todo si la dosis no es ajustada al grado de insuficiencia renal)<sup>3, 4</sup>. En cuanto a los factores descritos como protectores hallamos: suplementos de potasio, alcalinización urinaria, dietas ricas en calcio, polímeros de ácido aspártico, antagonistas cálcicos, carbenicilina y ticarcilina<sup>2</sup>.

Cuatro son los síndromes renales que los aminoglucósidos pueden generar, ya sea como entidades aisladas, o combinadas:

1. Insuficiencia renal aguda: suele aparecer a la semana de la exposición al fármaco y se presenta habitualmente con un patrón no-oligoanúrico. La elevación de enzimas: alanina aminopeptidasa, N-acetil-beta-D glucosaminidasa y gamaglutamiltransferasa, es uno de los marcadores más tempranos de daño renal<sup>2</sup>. Los análisis urinarios suelen mostrar proteinuria, cilindros hialinos y granulados<sup>1, 4, 5</sup>. La suspensión del antibiótico y su sustitución por uno no nefrotóxico constituye la principal medida en función de mejorar la función renal. Pese a la habitual reversibilidad de esta toxicidad el uso prolongado de estas drogas puede generar una insuficiencia renal crónica con requerimiento dialítico. La neomicina es la forma más nefrotóxica y la estreptomycinina la menos<sup>4</sup>.
2. Síndrome de Fanconi: consiste en la pérdida urinaria de origen tubular proximal de sustancias como glucosa, aminoácidos, potasio, calcio, magnesio y fósforo en forma aislada o conjunta. Este cuadro puede verse en ausencia de insuficiencia renal e incluso suele precederla<sup>2, 6, 7</sup>.
3. Diabetes Insípida: consiste en la inducción de diuresis acuosa debido a una resistencia de los túbulos colectores a la hormona antidiurética a raíz de una inhibición de la adenilato ciclasa<sup>2, 8</sup>.
4. Acidosis Metabólica Hiperclorémica: secundaria a una reducción de la excreción de protones y de la amonigenénesis<sup>2</sup>.

Conclusión: los aminoglucósidos son antibióticos útiles pero deben ser usados con precaución a raíz de su potencial nefrotoxicidad. Cuatro son las entidades renales que pueden generar:

**insuficiencia renal aguda, síndrome de Fanconi parcial o completo, diabetes insípida y acidosis tubular. La injuria renal suele ser reversible y mejora con la temprana suspensión de la droga.**

---

#### **References / Referencias**

- 1) Swan S, Bennett W. Nephrotoxic acute renal failure. In Lazarus JM, Brenner BM (Eds). Acute renal failure. New York. Curchill Livingstone. 1993: 361-362**
- 2) Ahijado FJ, Garcia S. Insuficiencia renal aguda por nefrotóxicos. In Liaño F, Pascual J. (Eds). Insuficiencia renal aguda. Barcelona. Masson.2000: 143-146.**
- 3) Gilbert D. Aminoglycosides. In Mandell D, Bennett S (Eds). Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia. Churchill Livingstone.2000: 318-321**
- 4) Chambers H. The aminoglycosides. In Goodman Gilman A, Limbird LE, Hardman JG (Eds). The pharmacological basis of therapeutic. New York. Medical Publishing Division. 2002: 1229-1230**
- 5) Lacy C, Armstrong L, Goldman M, Lance L. Drug information handbook Hudson. Lexi-Comp; 2003: 1115-1116.**
- 6) Tannen R. Potassium disorders. In Kokko J, Tannen R (eds). Fluids and electrolytes. Philadelphia. W.B Saunders Company. 1996: 153**
- 7) Pollak M, Yu A. Clinical disturbances of calcium, magnesium, and phosphate metabolism. In Brenner B, Rector (eds). The kidney. Saunders. 2004:1053-1061**
- 8) El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Taper H, Cumps J, Tulkens. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low dosis of aminoglycosides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2000; 44: 665-675.**

**Carlos Guido Musso  
Dept. of Nephrology.  
Hospital Italiano de Buenos Aires - Argentina**



ISSN: 1697-090X

[Inicio Home](#)

[Índice del volumen Volume Index](#)

[Comité Editorial Editorial Board](#)

[Comité Científico Scientific Committee](#)

[Normas para los autores Instruction to Authors](#)

[Derechos de autor Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)



## VALIDACION DE LA DOSIS DE DIALISIS MEDIDA CON *ONLINE CLEARANCE MONITOR* (OCM) Y EL Kt/V DE DAUGIRDAS 93.

S. Cigarrán MD, F. Coronel MD PhD, J. Torrente MD, MJ Rodríguez Cabrera DUE ML Torres Márquez DUE, E. Brunete Mayor DUE, V. Fernández-Palacios Ruiz DUE, C. García-Mauriño Mundi DUE, C. Lorenzo Ponce<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Técnico en electromedicina.  
Unidad Nefrológica Moncloa. Fresenius Medical Care (FMC). Madrid.

[cigarran@ctv.es](mailto:cigarran@ctv.es)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2004;2:5-12.

---

[Comentario del Dr. Jordi Bover](#). Fundació Puigvert. Barcelona. España.

[Comentario del Dr. Carlos Musso](#). Departamento de Nefrología. Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

---

### RESUMEN

**Introducción:** La morbimortalidad de los pacientes en tratamiento con hemodiálisis periódica depende de la edad, enfermedad de base y la calidad del tratamiento. El índice de Kt/V es el patrón de referencia de medición de dosis de diálisis. El método de la dializancia iónica (OCM, FMC) determina el Kt/V en tiempo real, mediante el aclaramiento de electrolitos. Evaluar si la medición de la dosis de diálisis mediante Kt/V medido por OCM se correlaciona con la dosis medida mediante el método de Daugirdas 93, ha sido el objetivo del presente estudio.

**Material y Métodos:** Se estudiaron prospectivamente 24 pacientes anúricos en hemodiálisis 3 veces por semana, estables durante al menos 6 meses, de edad  $64.75 \pm 18.24$  años, 16.7% mujeres y 20.8% diabéticos. La membrana utilizada fue polisulfona de alta permeabilidad (1.8 m<sup>2</sup>) y helixone (1.6 m<sup>2</sup>). El flujo del baño de diálisis no se varió. El cálculo del Kt/V Daugirdas 93 se realizó de acuerdo NKF-DOQI y el de OCM se determinó en la sesión intermedia semanal durante 3 semanas consecutivas. Los datos fueron procesados con SPSS 11.0 utilizando, regresión lineal, análisis de la varianza y t-student. Se consideró estadísticamente significativo con "p" < 0.05. El test de concordancia de Bland-Altman se utilizó para validar el método.

**Resultados:** La OCM tiene una estrecha relación con el Kt/V determinado por Daugirdas 93 ( $1.29 \pm 0.2$  vs.  $1.32 \pm 0.2$ , p < 0.001, r<sup>2</sup>=0.96, SEE: 0.08) El Test de concordancia de Bland Altman mostró (r<sup>2</sup>=0.05).

**Conclusiones:** La dosis determinada mediante OCM se correlaciona con el Kt/V de Daugirdas 93. Su aplicación, sin suponer sobrecarga de trabajo, permite el control adecuado de la diálisis, que la dosis prescrita sea obtenida constituyendo una herramienta de control de calidad y por consiguiente de adecuación de la terapia. Se necesitan estudios prospectivos que confirmen su influencia positiva sobre la morbimortalidad de los pacientes en hemodiálisis.

**Palabras Clave:** Dosis de diálisis. Dializancia iónica. Hemodiálisis. Online Clearance Monitor (OCM). Morbimortalidad.

### INTRODUCCION

La morbilidad y mortalidad de los pacientes sometidos a hemodiálisis periódica depende de un número de factores como la edad, la enfermedad de base y la calidad del tratamiento de diálisis. The National Cooperative Diálisis Study (NCDS) ha evidenciado la correlación positiva entre morbimortalidad y dosis de diálisis<sup>1</sup>. El índice Kt/V es aceptado por la comunidad científica como el mejor método para cuantificar la dosis de diálisis; siendo K el aclaramiento de urea, V el volumen de distribución de urea del paciente y t el tiempo de diálisis. Este índice está recomendado en las Guías clínicas de Hemodiálisis (DOQI) de la National Kidney Foundation<sup>2</sup>. En 1985, Gotch and Sargent<sup>3</sup> describen que un Kt/V inferior a 0.8 aumenta la morbilidad asociada a un tratamiento inadecuado.

Entre 1988 y bien entrados los 90, fueron de gran valor y ayuda para medir la dosis de diálisis las ecuaciones generadas por Daugirdas y cols.<sup>4-7</sup>. Hay autores que recomiendan que el Kt/V deseado debe ser igual o superior a 1.3 y en diabéticos debe llegar al 1.4<sup>8,9</sup>. Kjellstrand y cols<sup>10</sup> analizando los datos de Parker, Keshaviah y Charra evidenciaron que el riesgo de mortalidad decrece en relación inversa con el Kt/V una vez que éste es superior a 1.4. El desarrollo tecnológico de los sistemas de los monitores permite la medición en línea de diferentes solutos. Polaschegg et. al. en 1982 comienzan la medición de la dializancia por los cambios de la conductividad durante la diálisis y publican sus fundamentos en 1993<sup>11,12</sup>, ya que el aclaramiento basado en la conductividad refleja el aclaramiento de electrolitos, y por lo

tanto, de urea. El modelo matemático es publicado por Peticlerc et al en 1993 y encuentra correlación entre el Kt/V medido y prescrito mediante el método de dializancia iónica. Sin embargo, su utilización diaria no ha recibido mucha atención en la literatura no yendo más allá de la investigación. Con la evolución hacia la individualización de la dosis de diálisis y el control de la dosis prescrita en cada sesión, la dializancia iónica debería constituir un método de uso diario, una vez que tecnológicamente haya sido incorporada a los modernos monitores.

Con este estudio pretendemos evaluar la correlación de la dosis de diálisis determinada mediante el método de aclaración online (OCM) con el método de Kt/V estándar de Daugirdas de 1993.

## MATERIAL Y METODOS

### 1.-Población

Se realiza un estudio prospectivo y longitudinal en una población de 24 pacientes anúricos de nuestro centro; de los que 20.8% son diabéticos, 83,3% son varones y el 16,7% son mujeres. El 66,7% tienen serología negativa para HVC, HVB y VIH, siendo HVC positivos un 12,5%, HVB positivos un 8,3% y ambas positivas un 12,5%.

El resto de los datos epidemiológicos se describen en la Tabla I.

Tabla I: Datos epidemiológicos de los 24 pacientes del estudio.

	<b>MEDIA</b>	<b>Rango</b>
<b>EDAD (años)</b>	64,75 ± 18,24	31-86
<b>HCTO. (%)</b>	37,19 ± 3,30	29,9 -46,5
<b>PESO SECO (Kg.)</b>	69,71 ± 12,01	46,5 -99,3
<b>GANANCIA INTERHD (gr.)</b>	2266,67 ± 1016,67	500 - 4200
<b>TALLA ( m)</b>	1,65 ± 0.12	1,41 -1,95
<b>IMC ( Kg/m<sup>2</sup>)</b>	25,41 ± 3,83	18,22 -31,03
<b>TIEMPO HD (min.)</b>	245,21 ± 21,34	210 -320
<b>VOL. WATSON ( litros)</b>	36,83 ± 6,30	25,8 - 49,3

### 2.- Descripción y metodología

El Monitor de Aclaramiento online (OCM) es una opción de los monitores Fresenius 4008 HS que permite determinar el aclaramiento efectivo medio de urea (K), la dosis de diálisis (Kt/V) y la concentración de Na<sup>+</sup> plasmático. En la técnica de medición, descrita por Polaschegg<sup>11,12</sup>, el monitor efectúa una medición del aclaramiento en línea con la finalidad de detectar una posible reducción de la eficacia dialítica.

El módulo genera ciclos de medición a intervalos regulares; el sentido y desarrollo de los ciclos depende de los parámetros externos. Dos células de conductividad, una pre-filtro y otra post-filtro, compensadas en temperatura pero completamente independientes, miden la conductividad, que deberá permanecer estable durante 60", el sistema analiza la conductividad actual y decide el sentido de la variación, alternándola para registrar las mediciones tomadas de ambas células; la duración total es de 11'. El cálculo de la dosis de diálisis (Kt/V) incluye el volumen de distribución de urea (Vurea) que calcula la propia máquina, teniendo en cuenta (peso, altura, edad y sexo) usando la fórmula empírica de Watson.

La dosis de diálisis mediante Kt/V de segunda generación de Daugirdas se determinó en los 24 pacientes durante 3 semanas consecutivas en la sesión intermedia de acuerdo con las normas DOQI 2000 guías clínicas 2, 7 y 8. Estos pacientes se dializan 3 días a la semana durante 245,21 ± 31,24 minutos. El baño de diálisis fue estándar. Las membranas usadas fueron Helixone 1,4m2 (Fx-60 S, FMC) en 15 pacientes y PFS de alta permeabilidad 1,8m2 (HF-80 S, FMC) en 9 de ellos. Contamos con 4 tipos de accesos vasculares: 19 FAVI autólogas, 3 PTFE, 1 Perm-cath y 1 Shunt de Thomas, todos ellos en bipunción. El flujo eficaz fue siempre superior o igual a 330 ml/min. En ningún caso la medicación fue variada.

La fórmula del Kt/V utilizada fue la de Daugirdas de 1993 que es la siguiente:

$$Kt/V = -Ln [(C2/C1) - (0.008*T)] + [(4-3.5*(C2/C1)) * UF/P$$

Donde C1 es la urea inicial, C2 es la urea final, T el tiempo en horas y UF el cambio de peso prehemodiálisis y posthemodiálisis.

Las fórmulas de Watson et al (V) son las siguientes<sup>15</sup>:

$$\begin{aligned} \text{Hombres: } V &= 2.447 - (0.09156 * \text{edad}) + (0.1074 * \text{talla}) + (0.3362 * \text{peso}) \\ \text{Mujeres: } V &= (0.1096 * \text{talla}) + (0.2466 * \text{peso}) - 2.097 \end{aligned}$$

La fórmula de la superficie corporal utilizada fue la descrita por Dubois et al.<sup>16</sup>:



$$S.C. = \sqrt{[\text{Peso (Kg.)} * \text{Talla (cm.)}] / 3600}$$

### 3.- Estadística

Los datos fueron procesados con el programa estadístico SPSS 11.0 (Chicago, Illinois). Se utilizaron las tablas de contingencia, t student, análisis de la varianza y regresión lineal según fue necesario. El test de Bland-Altman <sup>17</sup> se utilizó para determinar la exactitud del método. Se consideró significativo estadísticamente para la p < 0.05.

### RESULTADOS

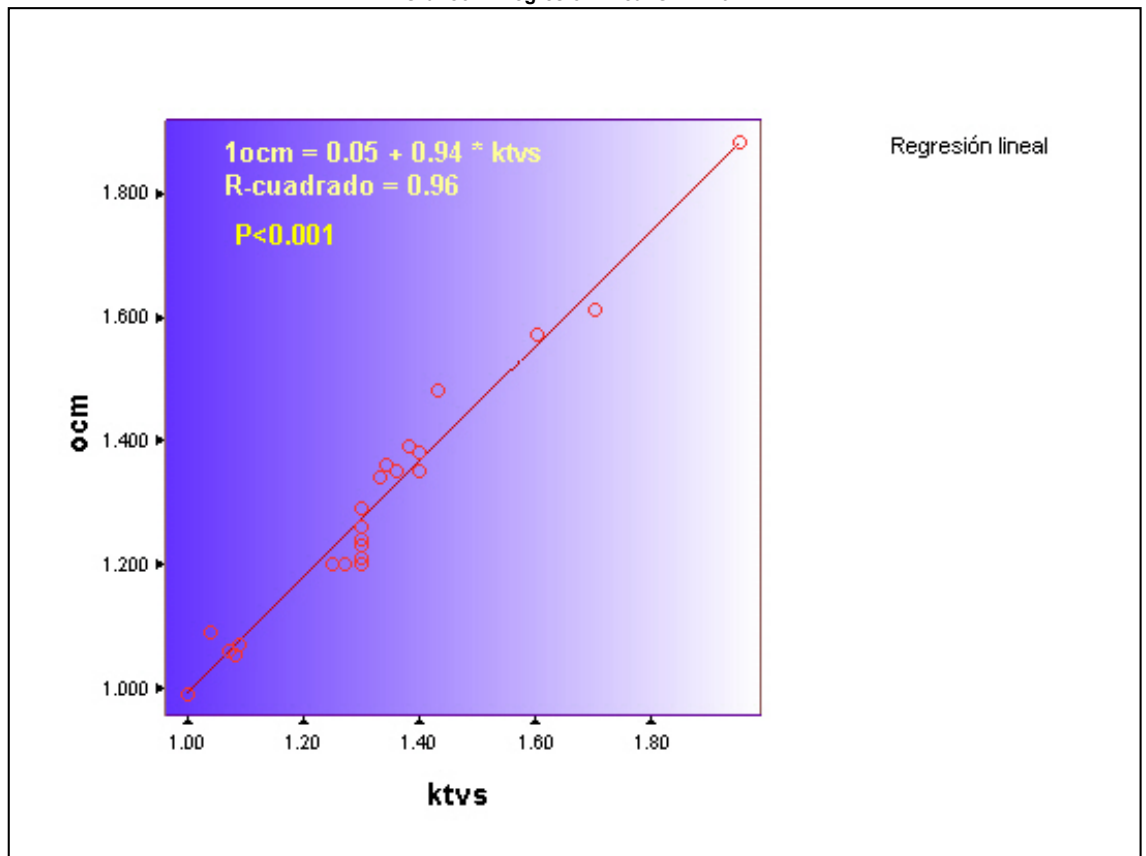
Encontramos una correlación positiva muy estrecha entre OCM y Kt/V sanguíneo bastante significativa (r<sup>2</sup> = 0.96) con p < 0.01 y correlación de Pearson = 0.981, como se muestra en el gráfico I.

Tabla II: Regresión Lineal Multivariante con variable dependiente Kt/V sérico

Regresión Lineal Multivariante					
	Coeficientes no estandarizados		Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
	Error típ.	Beta		Límite inferior	Límite superior
(Constante)	.242		.619	-.385	.630
SUPRFCOR	.179	-.223	.000	-.610	.138
IMC	.003	.024	.062	-.004	.007
VOLWATS	.006	.212	.000	-.005	.019
OCM	.083	.981	.000	.852	1.202

a. Variable dependiente: KTVS

Gráfico I : Regresión lineal OCM-Kt/V



Realizando el test de Bland-Altman (gráfico II) observamos que el OCM infravalora el Kt/V sanguíneo en un 0.05% cuando el Kt/V es mayor que 1.4; sin embargo lo sobrevalora en un 0.05% cuando es inferior a 1.4 (gráfico III).

Gráfico II: Relación Kt/V con superficie corporal.

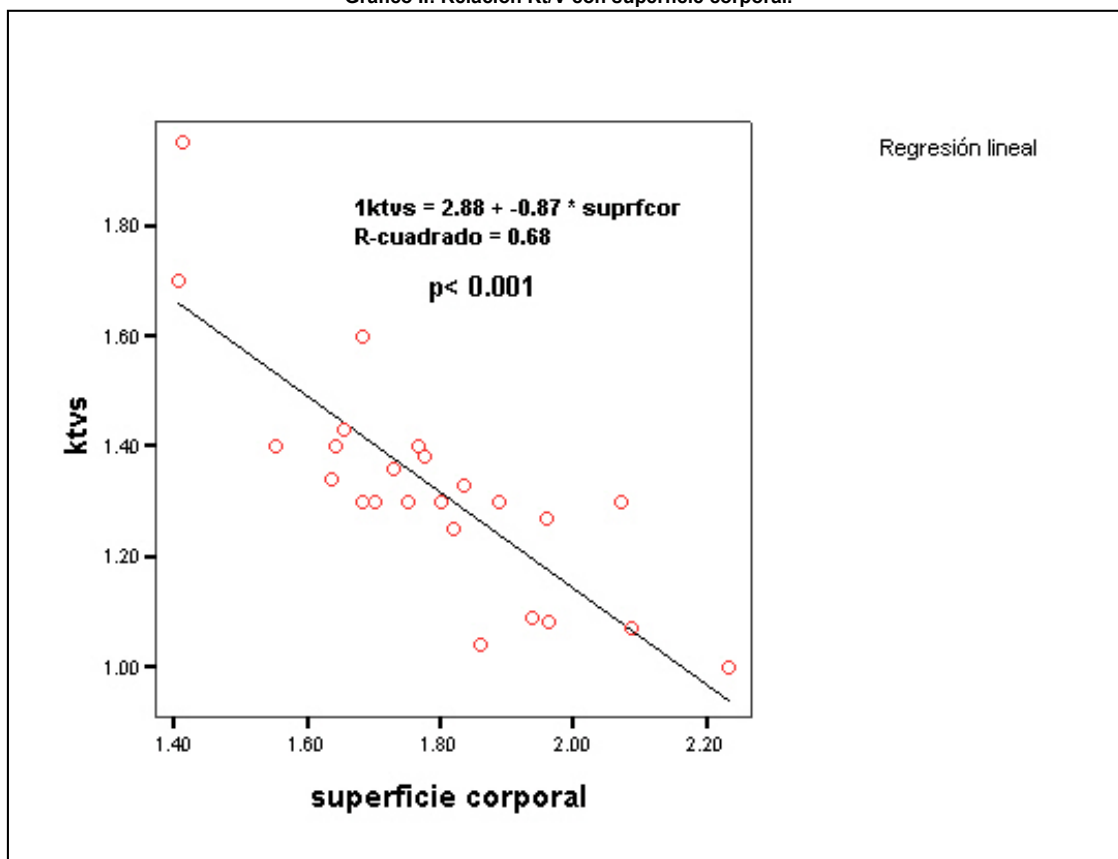
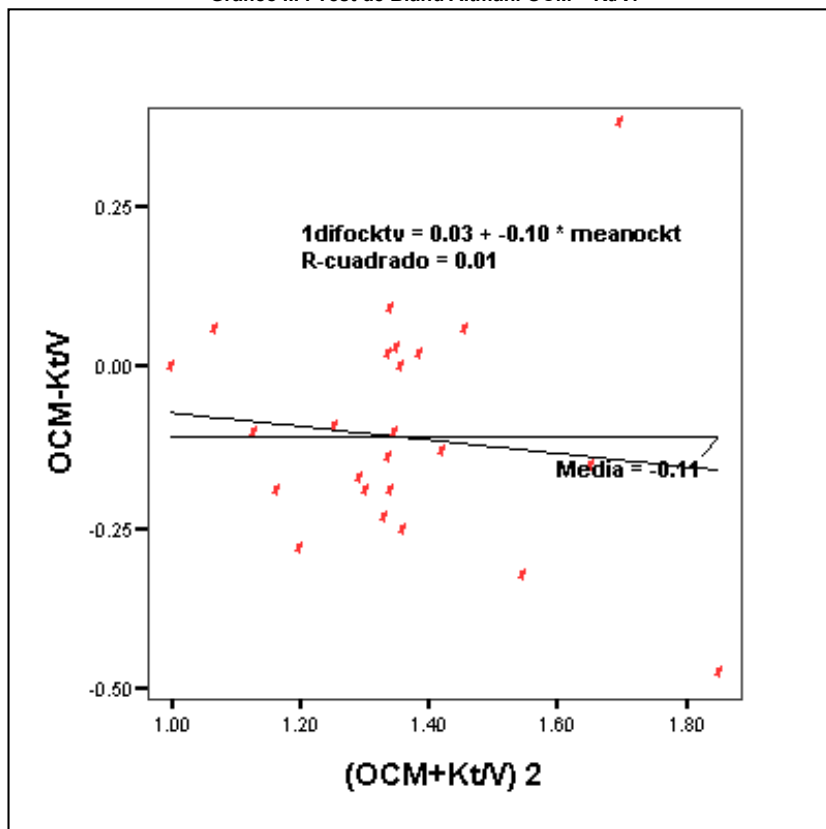


Gráfico III : Test de Bland Altman. OCM – Kt/V.



Tampoco encontramos diferencias entre sexos ni en relación a la patología de base ni a la serología. Observando la escasa diferencia entre lo prescrito y lo medido, detectamos que en nuestra población existe una relación inversa entre Kt/V y parámetros antropométricos como superficie corporal (gráfico V), IMC y Volumen de Watson (gráfico VI); viendo que los que tienen una mayor superficie corporal, IMC o Volumen de Watson  $\geq 40$  litros están en riesgo de recibir infradiálisis.



Grafico IV: relación OCM y superficie corporal

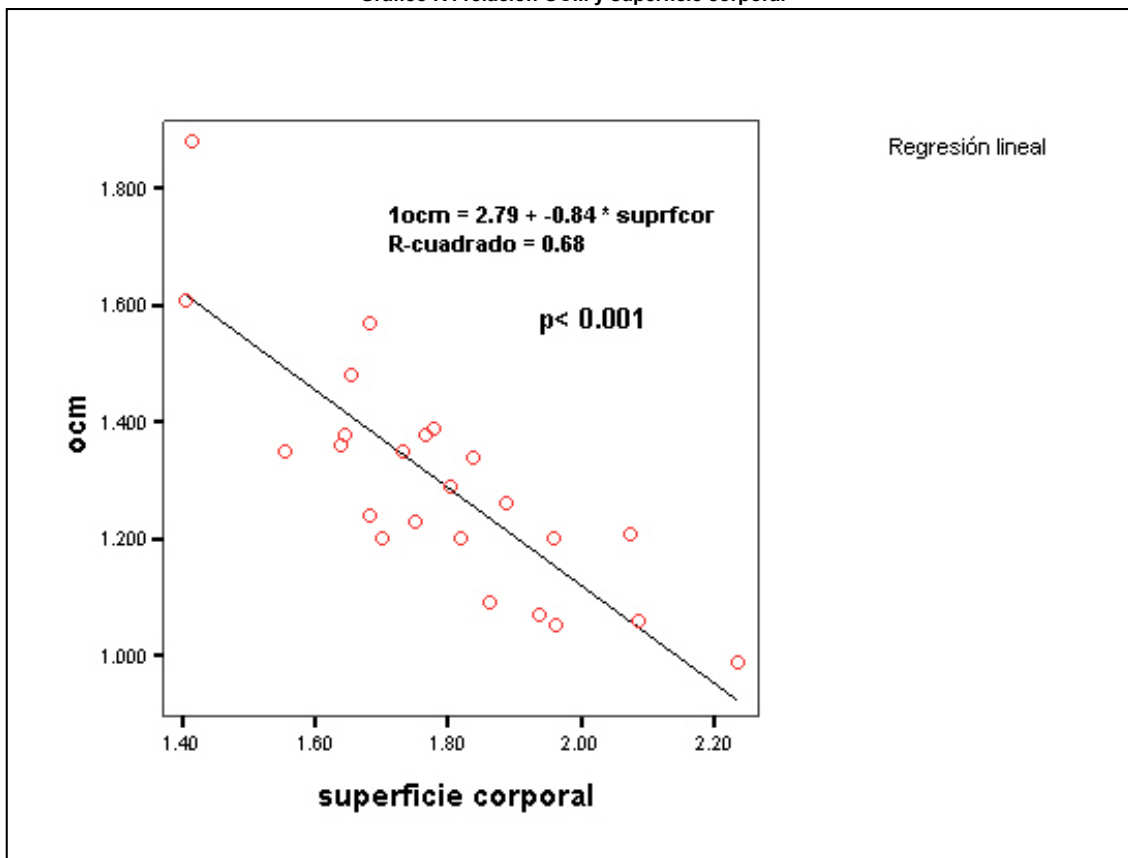
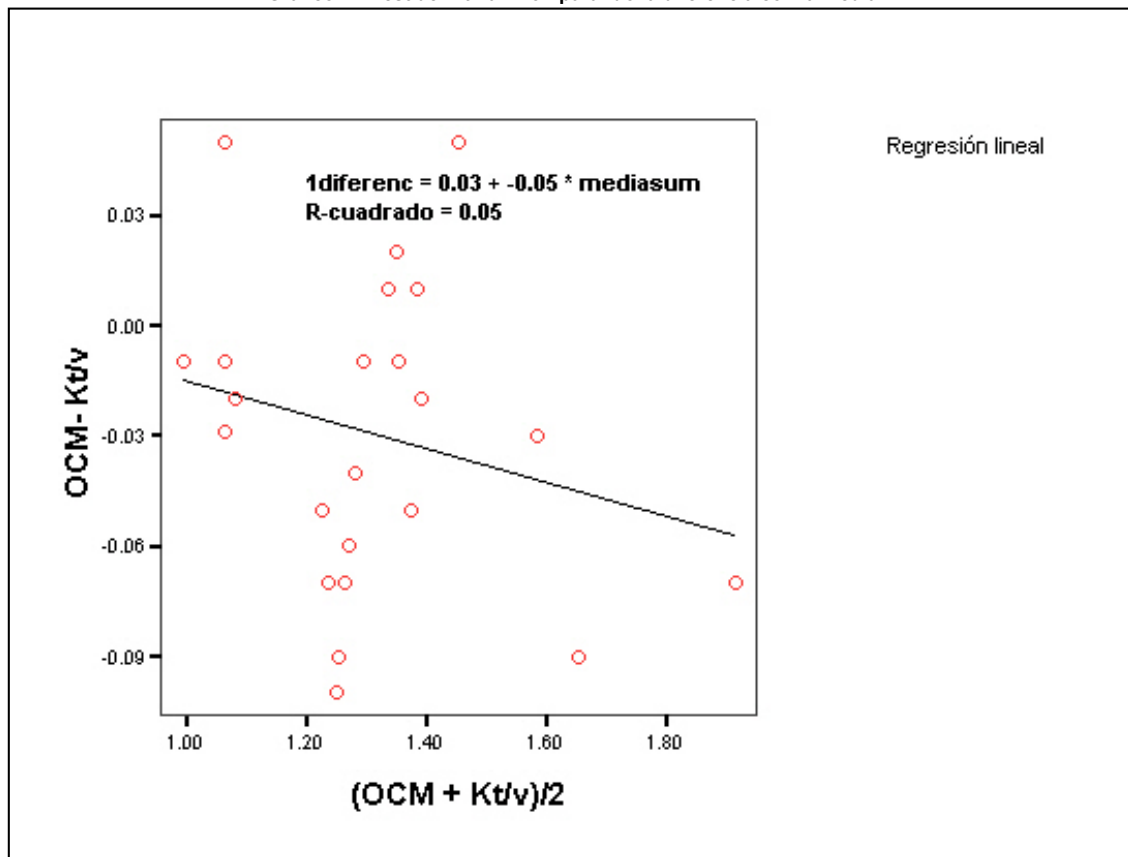


Grafico VI: Test de Altman Comparando la diferencia con la media



No encontramos diferencia significativa con el tiempo del tratamiento.

## DISCUSIÓN

La morbimortalidad del paciente en diálisis estrictamente depende de la adecuación del tratamiento. Por ello, el conocimiento de que la dosis de diálisis prescrita sea la obtenida es una medida esencial para asegurar el tratamiento adecuado. El índice más ampliamente usado para la prescripción y obtención de la dosis de diálisis es el cálculo del Kt/V sanguíneo descrito por Sargent y Gotch<sup>3</sup>, que es un método de valoración indirecta donde en un paciente anúrico K es el aclaramiento efectivo de urea del dializador, t es la duración del tratamiento y V es el volumen de distribución de la urea estimado mediante la fórmula de Watson. Es bien conocido también que el riesgo de mortalidad se reduce en un 7% por cada 0.1 de aumento del Kt/V por encima de 1.3<sup>17</sup>.

Normalmente se determina una vez al mes, asumiendo que el resultado de éste es extrapolable a todas las sesiones de diálisis hasta una nueva determinación. Es un método observador dependiente, es decir, está sujeto a posibles fallos de extracción, alteraciones de la muestra hasta que llega al laboratorio o errores de determinación de éste y además no es posible determinarlo frecuentemente por lo que es difícil averiguar si la dosis prescrita es obtenida en cada sesión.

El *gold standard* es la cuantificación directa basada en medir directamente la cantidad de urea depurada y medir con exactitud el volumen de distribución de la urea junto con el aclaramiento efectivo de urea. Esto requiere una recogida total o parcial de líquido de diálisis, lo que es prácticamente imposible de realizar diariamente.

En este aspecto la dializancia iónica supone un gran avance para medir la dosis de diálisis diariamente, pudiendo así ser más eficaces en la dosificación del tratamiento dialítico y por tanto dar un tratamiento de mayor calidad a los pacientes. Es un método automático, no precisa muestras de sangre ni reactivos, no requiere material fungible, ni sobrecarga a la enfermera que tan solo tiene que introducir en el monitor 5 parámetros predeterminados (edad, talla, sexo, peso seco y hematocrito), permite modificar la pauta en base a los parámetros suministrados en pantalla y reflejar el resultado en la gráfica al finalizar la sesión. También reduce el riesgo de accidentes con objetos punzantes al no tener que extraer sangre.

Otra gran ventaja es que detecta de forma precoz los problemas colaterales que pueden afectar a la dosis de diálisis, como son el aumento de la recirculación, estenosis, microcoagulación capilar, etc. Nuestro estudio demuestra la estrecha correlación que existe entre la dosis de diálisis determinada a través del OCM y la de Daugirdas 93, por lo que podemos asumir el OCM como herramienta segura y precisa para monitorizar la dosis de diálisis en cada sesión. De este modo podemos asegurar la efectividad de la misma especialmente en pacientes estables.

La técnica de OCM, incorporada a los monitores permite al personal de enfermería determinar si la dosis prescrita es alcanzada. Algunos autores<sup>19</sup> no están de acuerdo ya que el uso de la equivalencia entre la dializancia iónica efectiva y el aclaramiento dialítico eficaz de la urea puede producir errores en la estimación del Vt, aunque el Kt/V calculado como Dt/V es correctamente estimado. Nuestros resultados evidencian que el Kt/V calculado mediante OCM es equivalente al determinado una vez al mes como modelo cinético single pool (SPV) con una exactitud del 98%.

Sin embargo, un problema todavía sin resolver es la determinación de V, en el que la impedancia bioeléctrica<sup>20,21</sup>, método validado en poblaciones sanas y en la enfermedad renal, puede aportar mayor exactitud. En nuestra unidad en la que usamos la impedancia bioeléctrica de forma rutinaria, hemos encontrado que el volumen de Watson infraestima en 4.4 l la medición de agua total en los pacientes en hemodiálisis. Así mismo detectamos el riesgo que tiene los pacientes con V mayor de 40 litros de recibir una dosis inadecuada de diálisis. Estos pacientes además tienen un índice de masa corporal superior a 30 y una superficie corporal superior a 1.8m<sup>2</sup>, confirmando los hallazgos encontrados en este mismo sentido por otros autores<sup>22,23</sup>.

En conclusión, nuestro estudio demuestra que una vez que el volumen de distribución de la urea es estimado, la dializancia iónica mediante OCM permite determinar la dosis de diálisis en cada sesión haciendo posible el cálculo del Kt/V equilibrado, sin necesidad de extraer muestras sanguíneas mensuales. Ahorra tiempo y no sobrecarga a la enfermera, permitiendo la detección precoz de la inadecuación de la dosis de diálisis.

Se necesitan estudios prospectivos para evaluar si la correlación entre la dosis medida mediante dializancia iónica mantiene la misma correlación con SPPV a lo largo del tiempo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Uwe Kuhlmann, Rainer Goldau, Nader Samadi, et al.; Accuracy and safety of online clearance monitoring based on conductivity variation; *Nephrol. Dial Transpl.* 16: 1053-1058; 2001.
2. NKF-DOQI Clinical Practice Guidelines for Hemodialysis Adequacy. Update 2000. *Am. J. Kidney Dis.* 37 (Suppl 1): S7-S64, 2001
3. Gotch F.A., Sargent J.A.; Mechanistic analysis of the National Cooperative Dialysis Study (NCDS). *Kidney Int* 28:526-534. 1985
4. Daugirdas JT. Rapid methods of estimating Kt/V: three formulas compared. *ASAIO Trans.* 36: M362-M364, 1990.
5. Daugirdas JT. Second generation logarithmic estimates of single pool variable volume Kt/v : an analysis of error. *J. Am. Soc. Nephrol* 4: 1205-1213, 1993.
6. Daugirdas JT, Depner TA. A nomogram approach to hemodialysis urea modeling. *Am. J. Kidney dis.* 23: 33-40, 1994.
7. Daugirdas JT, Greene T, Depner TA et al ; Relationship between apparent (single-pool) and true ( double-pool) urea distribution volume . *Kidney Int.* 56: 1928-1933, 1999.
8. Colling, AJ et al. Diabetic Hemodialysis patients treated with a high Kt/V have a lower risk of death than standar Kt/V. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2:318 (abstract) , 1991.

9. Lowrie Eg, Laird NM, Parker TF et al. Effect of the hemodialysis prescription on patient morbidity. *N.Eng. J. Med* 305: 1176-1181, 1981.
10. Kjellstrand CM. Duration and adequacy of dialysis. Overview: The science is easy, the ethic is difficult. *ASAIO Journal*.43: 220-224, 1997.
11. Polaschegg HD: European patent nº EP0097366 priority June 21<sup>st</sup> 1982, publication January 4<sup>th</sup>, 1984. RP 0428927 (priority November 21<sup>st</sup>, 1989, publication May 29<sup>th</sup>, 1991).
12. Polaschegg HD. Automatic, non-invasive intradialytic clearance. *Int J Artif Organs* 16: 185-191. 1993.
13. Petitclerc T, Goux N, Reyner AL et al A model for non invasive estimation of in vivo dialyzer performances and patient's conductivity during haemodialysis. *Int. J.Artif.Organs* 16: 585-591,1993.
14. Petitclerc T, Benet B, Jacobs C, et al. Non invasive monitoring of effective dialysis dose delivered to the haemodialysis patient. *Nephrol Dial Trasplant* 10: 212-216, 1995.
15. Watson PE, Watson ID, Batt RD: Total body water volumes for adult males and females estimated from simple anthropometric measurements. *Am J. Clin. Nutr.* 33: 27-39, 1980.
16. DuBois D, DuBois EF: A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Arch. Int. Med* 17: 863-871, 1916.
17. Bland J, Altman D : Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 8: 307-310, 1986.
18. Held PJ, Port FK, Wolfe RA et al . The dose of haemodialysis and patient mortality. *Kidney Int.* 50: 550-556, 1996.
19. Teruel JL, Fernández Lucas M, Marcen R et. al. Calculo de la dosis de diálisis mediante la dialisancia iónica; *Nefrología* vol. XXI, 78-83, 2001.
20. Kushner RF. Bioelectrical impedance analysis: a review of principles and applications. *J.Am.Coll.Nutr.* 11: 199-209, 1992.
21. Chertow G, Lazarus JM, Lew NI et al. Bioimpedance norms for the haemodialysis population. *Kidney Int.* 32: 1617-1621, 1997.
22. Kuhlmann MK, Köning J, Riegel W et al. Gender specific differences in dialysis quality (Kt/V): "big men" are at risk of inadequate haemodialysis treatment. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14: 147-153, 1999.
23. Depner T, Daugirdas J, Greene et al. Dialysis dose and the effect of gender and body size on outcome in the HEMO study. *Kidney Int.* 65: 1386-1394, 2004.

---

Comentario del Dr. Jordi Bover. Fundació Puigvert. Barcelona. España.

El trabajo de los Dres Cigarrán et al. es un artículo que trata sobre el uso de un Monitor en línea del aclaramiento de Urea (OCM) para la monitorización de una sesión de hemodiálisis comparado con el método estándar.

Este trabajo demuestra la elevada correlación entre el Kt/V-dosis de diálisis determinada según Daugirdas 93 y el OCM con las implicaciones correspondientes respecto a la mejoría del manejo de estos pacientes. Se muestra especialmente que se trata de una herramienta precisa para monitorizar la dosis de diálisis de cada sesión. Sin embargo aunque potencialmente mejore la calidad del tratamiento (como se expone en las conclusiones) nunca se demuestra con los datos de este trabajo que mejore la morbimortalidad.

---

Comentario del Dr. Carlos Musso. Departamento de Nefrología. Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

En el presente estudio los autores midieron prospectivamente el Kt/V en 24 pacientes anúricos, bajo tratamiento hemodialítico, durante 3 semanas consecutivas, en la sesión intermedia, y usando dos métodos a la vez: el aclaramiento de electrolitos (OCM) y la fórmula de Daugirdas 93, considerada esta última el "gold standard" para la evaluación de la dosis de diálisis. Luego analizaron la correlación de las mediciones logradas por ambos métodos.

El Kt/V medido mediante OCM, consiste en la obtención de dicho parámetro en base a la medición online de los cambios en la conductividad. Las ventajas de esta modalidad de medición del Kt/V radica en su facilidad para ser tomada incluso en todas las sesiones (respecto del Kt/V habitual que se mide mensualmente) y su independencia respecto de la toma de muestras de sangre, con todos los riesgos y complicaciones que esto puede evitar.

El estudio mostró una muy buena correlación entre ambos métodos: Kt/V (OCM):  $1,29 \pm 0,2$  y Kt/V (Daugirdas):  $1,32 \pm 0,2$ ;  $r: 0,96$ ;  $p: 0,001$ .

El artículo es muy interesante y está bien hecho pero creo que amerita los siguientes comentarios:

A) Si aceptamos como "gold standard" para la evaluación de la dosis de diálisis el Kt/V, debiéramos en realidad tomar como test de referencia el "Kt/V equilibrado" (eKt/V), el cual se obtiene utilizando en la fórmula de Daugirdas una urea post-dialítica proveniente de una muestra obtenida luego de 30-60 minutos de la desconexión.  $eKt/V: -\ln(\text{Req} - 0,008 \times t) + (4-3,5 \times \text{Req}) 0,55x \text{ UF/V}$

El fundamento de esto es que la urea presenta una redistribución desde el compartimento intracelular al intravascular, que continúa más allá de la desconexión de diálisis, por un lapso de 30-60 minutos.

La otra opción sería utilizar la urea post-dialítica de una muestra tomada en la desconexión inmediata, pero usando una fórmula de Kt/V que puede predecir la cantidad de urea que se va a redistribuir durante los primeros 30-60 minutos post-desconexión (Daugirdas – Schneditz, 1997), evitándose así la espera en la toma de sangre post-dialítica:

- $eKt/V: spKt/V - 0,6 \times (spKt/V) / t + 0,03$  (acceso arterial)
- $eKt/V: spKt/V - 0,47 \times (spKt/V) / t + 0,02$  (acceso venoso)

Por otra parte estimo que el Kt/V OCM, al obtenerse intra-diálisis, debe ser menos exacto que el eKt/V, pues no debe sentir la redistribución final de la urea.

Referencia: Daugirdas J, Van Stone J. Physiologic principles and urea kinetic modeling. In Daugirdas J, Blake P, Ing T (eds). Handbook of Dialysis. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins; 2001: 27-35.

B) Que el Kt/V sea el "gold standard" para evaluar la dosis de diálisis no es universalmente aceptado.

Existe mucha evidencia de que la remoción de mediana molécula, más que la remoción de urea, es lo que correlaciona con la supervivencia y el bienestar de los pacientes en hemodiálisis crónica. Una parte muy importante de esta evidencia lo constituyen los resultados obtenidos sobre más de 1000 pacientes atendidos en el programa del Dr. Tassin (Francia).

En base a estos hechos Belding H. Scribner and Dimitrios G. Oreopoulos han propuesto un nuevo parámetro para evaluar la dosis de diálisis, al que llamaron "producto hemodialítico" (HDP), el cual se obtiene con la siguiente fórmula: HDP: horas de cada sesión dialítica x (número de sesiones semanales)

En este contexto se considera una buena dosis de diálisis un HDP: 72 (implica 3 sesiones semanales de 8 horas cada una), logrando la habitual sesión trisemanal de 5 horas cada una, tan sólo un HDP: 45, considerado en este sistema como una dosis "borderline".

Referencia: Scribner BH, Oreopoulos DG. The hemodialysis product (HDP): a better index of dialysis adequacy than Kt/V. Dialysis & Transplantation. 2002; 31: 13-15

---

Recibido: 3 diciembre de 2003. Recibido revisado 12 de Abril de 2004.  
Publicado: 7 de Mayo de 2004



ISSN: 1697-090X

[Inicio Home](#)

[Índice del  
volumen Volume  
index](#)

[Comité Editorial  
Editorial Board](#)

[Comité Científico  
Scientific  
Committee](#)

[Normas para los  
autores  
Instruction to  
Authors](#)

[Derechos de autor  
Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)



## A NANOSCALE POLYNUCLEOTIDE-NEUTRAL LIPOSOME SELF-ASSEMBLIES FORMULATED FOR THERAPEUTIC GENE DELIVERY

Erhan Süleymanoglu,

Department of Physical Chemistry of Drugs, Faculty of Pharmacy, Biophysics Section, and  
The Slovak Academy of Sciences, Institute of Experimental Physics, Department of Biophysics,  
Košice, The Slovak Republic

[erhan @ post.cz](mailto:erhan@post.cz)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2004;2:13-35.

---

[Comment reviewer Prof. Ernesto Moro, MD. PhD.](#) Prof. of Histopathology. Health of Sciences Faculty, University  
Rey Juan Carlos. Madrid, Spain

[Comment Reviewer Prof. Pilar Muñiz Rodríguez PhD.](#) Biochemistry and Molecular Biology. University of  
Burgos. Spain..

[Comment Reviewer Jose Nazario PhD.](#) (Biochemistry). Researcher, Arbor Networks. Ann Arbor. USA.

---

**Abstract:** Human gene therapy research is currently discouraging due to the lack of suitable delivery vehicles for nucleic acid transfer to affected cell types. There is an urgent need for optimized gene delivery tools capable of protecting the polynucleotide from degradation through its route from site of administration to gene expression.

Besides difficulties arising during the preparation of the currently employed cationic lipids, their cytotoxicity has been an unavoidable hurdle. Some energetics issues related to preparation and use of self-assemblies formed between neutral lipid and polynucleotides with various conformation and size are presented.

The divalent metal cation-governed adsorption, aggregation and adhesion between single- and double-stranded polynucleotides with multilamellar and unilamellar phosphatidylcholine vesicles was followed turbidimetrically. Thermotropic phase transitions of zwitterionic liposomes and their complexes with polynucleotides and calf thymus DNA with  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  is presented and compared to the previous data for various electrostatic lipid-nucleic acid complexes.

Differential scanning microcalorimetric measurements of synthetic phosphatidylcholine vesicles and polynucleotides and their ternary complexes with inorganic cations were used to build the thermodynamic model of their structural transitions. The increased thermal stability of the phospholipid bilayers is achieved by affecting their melting transition temperature by nucleic acid induced electrostatic charge screening. Thermodynamic measurements give evidence for the stabilization of polynucleotide helices upon their association with liposomes in presence of divalent metal cations. It is thus possible to suggest this self-assembly as an improved formulation with further potential in gene therapy trials. Although the pharmacodynamical features of the zwitterionic lipid-metal ion-DNA nanocondensates remain to be tested in

further transfection experiments, at least from physicochemical viewpoint, stability parameters are encouraging to consider them as a promising metal-based nucleic acid pharmaceuticals.

**Keywords:** Zwitterionic lipid - polynucleotide self - assemblies; divalent metal cations; differential scanning microcalorimetry; phase transitions; non-viral gene delivery

## INTRODUCTION

Spontaneously formed self-organized systems comprise the multidisciplinary research interest. Beside the biologically inspired interest in fundamental property of the living matter to form self-assembled assemblages, they are approached by physical chemists, as well, in terms of pure supramolecular reasoning.

These structures are often investigated to test proposed colloidal and physicomathematical models. Thus, the idea have been to build various complexes between smaller substrates and their larger guests (host-guest complexes). Numerous host-guest complexes were studied at different levels and viewpoints<sup>1</sup>. Thus, ions and larger charged molecules were non-specifically complex or conjugated with oppositely charged or neutral species. Subsequently, their relevant natural counterparts were searched for. From generally encountered basic types of biomacromolecule associates-lipids, polysaccharides, proteins and nucleic acids, principally six types of covalent and non-covalent pairs of complexes can be formed.

However, very few were described so far. Interestingly, no any complex formed between lipids and nucleic acids is investigated in depth, and the current knowledge concerning them at *in vivo* level is insufficient. This assembly is reported only for isolated molecules in organic solvents, which are the subject of preparative biochemistry. Cellular events, however occur in macromolecularly crowded surroundings. Hence, lipid complexes with nucleic acids have been regarded as artificial laboratory or microscopy preparations.

Researchers from the origin of life field considered them as a primitive cellular forms in a RNA-dominated primordial soup. Subsequently, such self-assemblies have been looked for in crucial cellular events. In prokaryotes, example of such aggregate is mesosome, which itself has been considered as an accidental artifact formed during specimen preparation for microscopy, or another macromolecular biopolymers occurring during bacterial nucleoid packaging and segregation. mRNA maturation and transport through nuclear pores, cell division and phage infection are the examples of nucleic acid-lipid interactions among eukaryotes. Attempts to isolate this labile complexes *in vivo* currently face certain problems. The difficulty of describing these complexes at the cellular level are their instability, in relation to their kinetics of formation.

Recently, the research interest on interactions between lipids and both DNA and RNA of different sizes and conformations has arisen after realization of their potential for employment as gene carriers in human gene therapy. Despite voluminous research reports on nucleic acid aggregation with liposomes of various lipid composition, the colloidal factors and forces governing their complex formation remain to be understood. Additional requirements of size homogeneity, stability, ability to keep the entrapped therapeutic gene sequence in sufficient concentration and reproducible manufacturing issues render the development of such gene carriers difficult. Thus, clinical trials indicate that little has been achieved concerning efficiency for the patients. Making reliable viral vectors is highly problematic. Attention has switched to construct a safer non-viral alternative. Currently, polycation- and lipid complexes with DNA, or combinations between them, have been developed as promising non-viral gene therapeutic vehicles.

Therapeutic gene transfer is regarded as employment of polynucleotide sequences as medicines to cure disease, or more specifically is referred to as nucleic acid delivery to patients for subsequent clinical benefit<sup>2-7</sup>. This goal is achieved by using viral or non-viral, synthetic or physical methods. The latter uses mainly electroporation protocols, which are well-described mathematically. However, electric field induced DNA transfer face problems with electrodeformation of the nucleic acid, physical entry of DNA into the desired cell type and show high dependence on ionic conditions employed in the experimental design<sup>8</sup>.

The clinically well-established viral-based delivery vectors<sup>5,9</sup> are superior in terms of efficiency compared to other transgene carriers. These vehicle constructs include a variety of mamalian, insect (e. g. baculovirus expression systems) and bacteriophage constructs. Both highly successful (adenoviral vectors) and those possessing poor gene delivery capabilities (e. g. retroviral constructs) are known<sup>5</sup>. The major concern regarding viral-based gene delivery is due to their immunotoxic side effects<sup>5,9</sup>. In this context, it is widely believed that non-viral gene therapy will surpass viral delivery systems in time. Non-viral nucleic acid therapy includes complexes obtained from DNA-synthetic polycations (polyplexes)<sup>1,10,11</sup>, or DNA-lipid (lipoplexes) mixtures<sup>12</sup>. The objective is to increase the transgene expression, with improved bioavailability and decreased toxicity of both carrier systems.

Once formed, polyplexes or lipoplexes should enter the desired cells for further expression of the therapeutic



gene activity (Fig. 1). The route shown on Fig. 1 involves numerous well-documented problems<sup>5-7</sup>. Thus, both particles often aggregate in serum much before approaching the target site. Moreover, both of these unfortunately heterogeneous nanometric structures are neither cell-type specific nor able to enter cell interior within desirable time. Once inside the cell, further stability and aggregation problems continue. Despite the initial hope that polyplexes can escape degradation by late endosomes, current laboratory data indicates the frequent occurrence of the opposite effect.

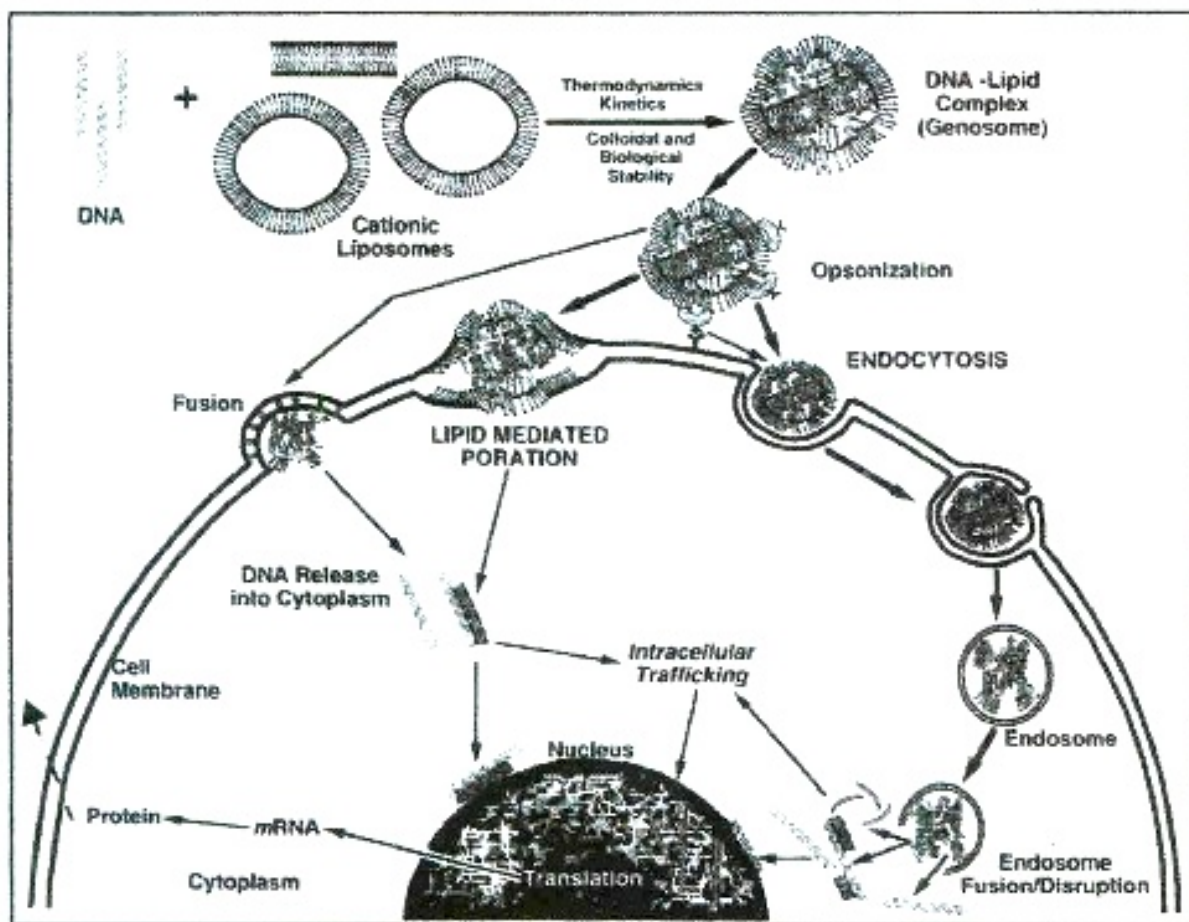


Fig. 1. A current view of entry routes of lipoplexes in target cell. Three mechanisms referred to as receptor-mediated endocytosis, lipid-mediated poration and lipid fusion are depicted to show the hurdles for efficient transfection. Original drawing by Dr. D. E. Hansen (NIH).

Since lipid-based systems are preferred to polyplexes (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>) our research is focused on the well-established potential of liposomes<sup>2,4,13</sup> as gene carriers. As reviewed recently<sup>6,7</sup>, synthetic non-viral vectors have numerous advantages compared with viral carriers. They show lower immunogenicity with diminished potential for oncogenicity. Nucleic acids with a variety of sizes, ranging from short oligonucleotides to artificial chromosomes, can be delivered. Moreover, they permit performance of simpler quality controls, as well as easier satisfaction of pharmaceutical prerequisites<sup>6</sup>.

The currently built models on DNA-lipid systems are based on research devoted to initial biophysical and ultrastructural characterization of either plasmid DNA or another model nucleic acid with mostly cationic lipids followed with a transfection assay to test their efficiency for intracellular transport in cell cultures. We have focused more on synthetic lipids than the nucleic acid itself. Following our current approach to consider poly(ribo)nucleotide-(phospho)lipid self-assemblies both from above mentioned cell biological and practical viewpoints, it is interesting to develop constructs of smaller oligo- and polynucleotides, as well as other nucleic acids as complexes with lipids.

In our opinion, such studies will open new insights into unravelling the yet undescribed nucleic acid receptors on cell surfaces with implications in development of certain pathologies<sup>14</sup>. On the other hand, the recent emphasis on use of oligonucleotides in gene delivery studies need primarily biophysical stability data on their complexes with lipid carriers<sup>15</sup>.

Viruses have an evolutionary driven uncomparably higher capacity for transfection compared to non-viral agents.



They achieve this by destabilizing the host cell membrane via viral fusion followed by cellular penetration of nucleic acids. This is thought to be DNA size-dependent and electrostatically controlled event. The exact nature, properties and way of action of molecules that can destabilize cell membrane is unclear. Hence, one approach to improve transfection efficiency of therapeutic gene carriers is to mimic the way of action of viruses. In designing novel synthetic viral nucleic acid delivering systems, through such a membrane fusion pattern, instead of receptor mediated pathway, it is important to consider the more naturally encountered electrified surfaces.

The present study reports some new results concerning kinetic and thermodynamic parameters of phospholipid-nucleic acid array formations. The objective is to describe initial complexation features of these organized molecular systems, emphasizing the use of zwitterionic species as alternatives of the cytotoxic cationic lipids, as also suggested previously by Kharakoz et al (1999)<sup>16</sup>.

Literature survey shows that usually laboratory protocols use simply addition of DNA to liposome suspension, with their subsequent mixing in various lipid/DNA ratios. Since, the latter is highly dependent on the nucleic acid and liposome size and type, instruments used and experimental designs, the reported parameters are often speculative and contradictory to each other.

Hence, our aim was also to compare our data with previous measurements for optimization of our currently employed laboratory setup. Our efforts are focused on nanoaggregates formation between liposomes and DNA, mediated by inorganic cations, condensing the whole complex. The motivation for this particular design comes from recent reports on positive effects of Ca<sup>2+</sup> on transfection efficiency<sup>17</sup>. The particular properties of phosphatidylcholine vesicles' complexation with polynucleotides and calf thymus DNA in the presence of Mg<sup>2+</sup>, are reported. More specifically, Mg<sup>2+</sup> was chosen as a condensing agent, due to its role in regulating various cellular functions. Having considered the high physiological concentration of Mg<sup>2+</sup> intracellularly, ADP and ATP exist mainly as their Mg<sup>2+</sup>-complexes, which has further implications in enzymatic reactions utilizing hydrolysis or synthesis of ATP. Moreover, Mg<sup>2+</sup> is an tremendous agent for phosphate group transfers<sup>18</sup>, making it a preferable naturally occurring element compared to currently employed synthetic polymers, which are not encountered in biofluids.

On the other hand, the transport of ions occurs partly via metal binding to amphiphilic membranes. Since phosphatidylcholine is generally a major member of the total natural phospholipid bilayers, it is important to study the interaction with a variety of metals. Thus, employing Mg<sup>2+</sup>-phosphatidylcholine system would give further data on biological importance of metal ion control of biomembrane fluidity. Relevant comparisons with Ca<sup>2+</sup> and related neutral lipids are mentioned at appropriate points as well. Since DNA transfer and cellular internalization are size dependent processes, the use of polynucleotide species of different size, base composition and chain conformation is emphasized.

## MATERIALS AND METHODS

### *Materials*

Synthetic polyriboadenylic acid: polyribouridilic acid (poly(A:U)<sub>n</sub>), polyriboguanilyc acid: polyribocytidylic acid (poly(G:C)<sub>n</sub>) duplexes (200 kDa each) polycytidilic acid (poly(C)<sub>n</sub>), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC) and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), solid HEPES, SSC and TRIS buffer reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and used without further purification. All other reagents were of analytical grade.

### *Methods*

#### *Preparation of Polynucleotide Solutions and Concentration Determinations*

Four different polynucleotides (SIGMA) were dissolved in buffer. Concentrations of single- and double-stranded polynucleotides were determined spectrophotometrically by using the molar extinction coefficients per base pair, as employed previously<sup>19</sup>. During all kinetic and calorimetric experiments, polynucleotide concentrations were 0.14 mg/1 ml 10 mM particular buffer/10 mM NaCl, pH=7.22.

Calf thymus DNA with MW of 8.6 MDa (= 13 kb), 42% GC, T<sub>m</sub> = 87°C, ~20 A<sub>260</sub> units per mg DNA was used.

Polinucleotide concentrations and molar ratios are based on the average nucleotide molecular weight of 308<sup>20</sup>.

#### *Preparation of liposomes*

Chromatographic tests for purity of the lipids were not performed, however the purity of the lipid preparation was assured from the half-widths of their main phase transitions<sup>21</sup>. 1.2 mM lipid in standard SSC, HEPES and

phosphate buffer, pH=7.2 was used in all experiments and was stored at 4°C.

The formation of a thin layer of lipids of a 15 ml round-bottomed flask was achieved by a hand-shaking and hydration in particular buffer at around 70°C. Vortexing of the lipid with the desired aqueous solution above the gel-to-liquid crystalline phase transition of the lipid ( $T_m$ ) for around 30 min resulted in multilamellar vesicles.

The DNA concentration used throughout all experiments was 1.8 mM based on the above mentioned assumption.

Unilamellar vesicles were obtained by extrusion of multilamellar vesicle suspension through two stacked polycarbonate filters (Nucleopore, Inc.) of 100 nm pore size at around 60°C. Repeated extrusion (10 times) through the extruder (Lipex Biomembranes, Inc., Vancouver, B. C., Canada) created homogeneous vesicle suspension. This allowed the preparation of vesicles with a mean diameter of 90 nm and a trap volume in the range of 1.5 – 2.0 l/mole.

#### *Preparation of liposome-nucleic acid mixtures*

Nucleic acid-lipid mixtures were prepared 1 hour before turbidimetric measurements by vigorous mixing of either phosphatidylcholine MLV or ULV dispersions and solvent, varying nucleic acid concentration and keeping DPPC concentration fixed. Control experiments of DNA-lipids in the absence of divalent cations, DNA-metal ions, and DPPC-metal ions were performed in parallel. Lipid vesicles' concentration was 0.3 mg/ml.

The lipid samples were hydrated, as described above to form first MLV. The preparation of phosphatidylcholine ULV-polyribonucleotide duplexes, or with calf thymus DNA, was the same as in the case of MLVs, i.e. by mixing DNA solution with aqueous DPPC dispersion in the presence of Mg<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup>.

The DNA concentration used throughout all experiments was 1.8 mM based on the above mentioned assumption. A freeze-thaw protocol was followed to ensure equal distribution of solutes between lamellae and adequate hydration of the lipids.

Comparison with the case of liposomal preparations without employing freeze-thaw procedure showed no difference in terms of homogeneity of the suspension. This was done by placing the sample in a cryo-tube and freezing it in liquid nitrogen for around 30 sec. The cryo-tube was subsequently removed and was plunged into warm water (~60°C). When the sample was thawed, the whole cycle of freeze-thawing was repeated 6 times.

#### *UV/VIS Spectrophotometry*

The concentration of DNA was checked from ultraviolet (UV) absorption at 260 nm using the relation 1.0 absorbance unit (A)=50 µg/ml nucleic acid. The whole spectrum was scanned for lipids, and the maximum absorption peak value was chosen as a wavelength for further measurements.

While these measurements were performed at constant temperature of 25±2°C, the kinetics of metal cation induced complexation between polynucleotides and liposomes were recorded at different temperatures both below and above their phase transition temperature in order to follow the DNA-induced change of lipid fluidity.

The spectra of phospholipids and polynucleotides alone, or their combinations in the presence of Mg<sup>2+</sup> were recorded with Shimadzu A160 double beam spectrophotometer (Shimadzu Co. Ltd., Japan) using 3 ml quartz cuvettes thermostated within ±0.3°C by circulating water bath connected to the cuvette holder.

Temperature inside the cuvette was controlled by a thermocouple. For this, the reference cuvette was thermostatted and the measurement cuvette heated, automatically recording change in optical density at the constant rate (2±0.2°C).

The fluctuation of the parameters of the helix-to-coil transition of polynucleotides due to imbalance of chain melting did not exceed statistically significant limits (0.6°C)<sup>22</sup>. Linear heating and cooling of the samples was performed at constant rates using distilled water as a standard, as described<sup>21</sup>.

The absorption spectra of polynucleotides and lipids were separated from each other by simultaneously performing the measurements at their corresponding wavelengths, respectively<sup>23</sup>.

### Turbidimetric Measurements

The preferred method for following polynucleotide adsorption and adhesion on liposome surfaces leading to electrostatically driven formation of larger aggregates is employment of turbidity measurements. This method is more suitable than the light scattering determinations, since there is no angular dependence involved, occurring for solutions of liposomes with diameters greater than ~20 nm, or ~1/20th of the wavelength of incident beam. Hence, wavelength corrections due to light scattering are not needed<sup>24,25</sup>.

The kinetics of polynucleotides with zwitterionic vesicles in the presence of Mg<sup>2+</sup> was followed turbidimetrically at both below and above lipid phase transition temperature, as described above.

To avoid turbid solutions occurring during the lengthy determinations, two wavelength measurements were performed, which showed the same trend. Care was taken to prevent precipitation of MLVs during these assays by loading them with 16.2% sucrose solution.

The scheme of kinetics of divalent metal cation triggered complexation of polynucleotides with phospholipid vesicles is shown on Fig. 2. The aggregation of the three molecular species during the first 5-10 min. was followed, since prolonged assays did not result in any further significant increase in turbidity. Divalent metal cations were added at the 30th sec. of the initial polynucleotide-MLV or ULV binary mixture with subsequent stirring of the cuvette.

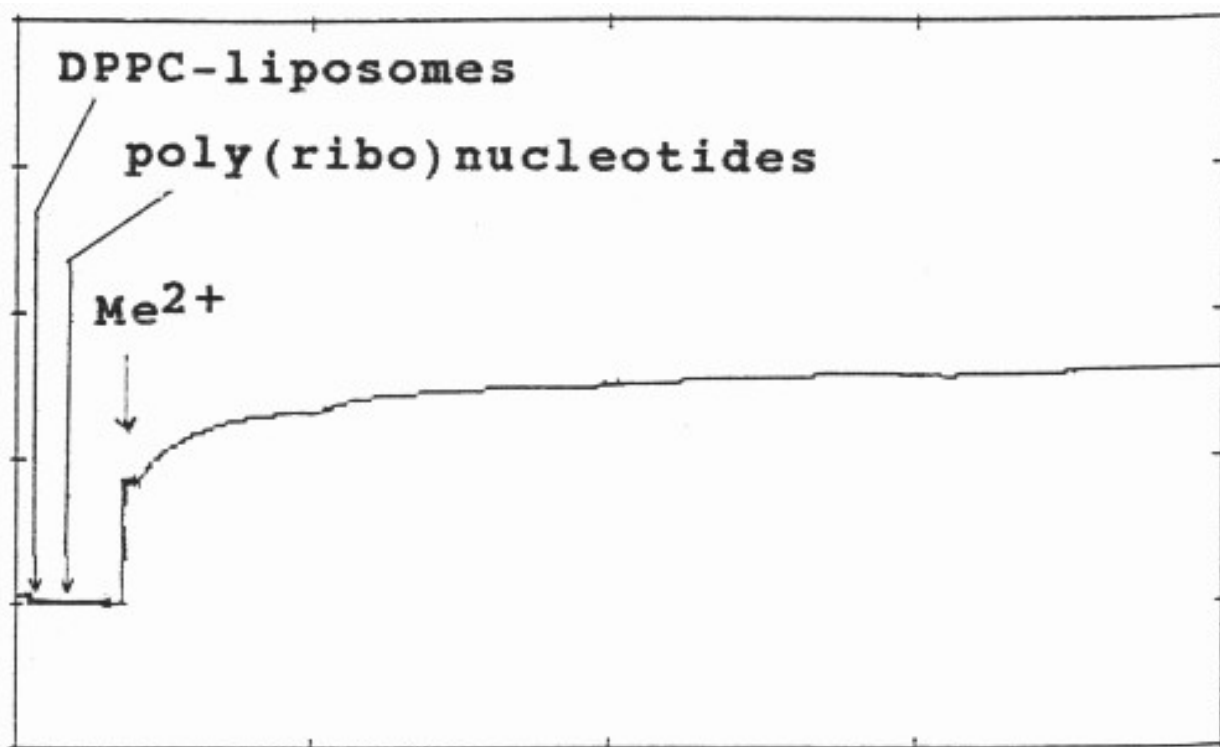


Fig. 2. Aggregation and kinetics of adsorption of DPPC-MLV and ULV with poly(ribo)nucleotides in the presence of divalent metal cation ( $Me^{2+}$ ) at constant temperature at 550 nm. After their preparation, both MLV and ULV were left for 1 hour. Their initial absorbance vary with respect to each other due to their different lamellarity, curvature and homogeneity. The stock solutions of poly(ribo)nucleotides and calf thymus DNA were prepared freshly and used immediately before measurements. After zeroing of the initial apparent absorption, their complexation with lipid vesicles was followed during the first 30 sec. Metal ions ( $Me^{2+}$ ) were added to the binary mixture of polynucleotide and liposomes at the final concentration of 0.5 mM and the mixture was mixed in the cuvette. The formed triple biopolymer complex is destroyed by EDTA treatment. The evaluation of their ternary complex formation was performed, as outlined in Materials and Methods.

The increase in turbidity of the aggregate after addition of the metal cations were plotted on chart recorder and used afterwards for estimations of statistical significance. Aggregation rate constants were calculated from the initial slopes of the turbidity ( $\tau$ ) as a function of time ( $t$ )<sup>26</sup>.

$$k_{11} = \frac{(1/t_0)(dt/dt)_0}{[(C_2/2C_1)-1]N_1}$$

&where  $k_{11}$  refers to the rate constant of doublet formation,  $t_0$  is the initial turbidity,  $N_1$  the number concentration, and  $[(C_2/2C_1)-1]$  is the optical factor. All terms in this equation were substituted with relevant

values, according to Gamon *et. al.*, (1989)<sup>26</sup>. The optical factor was determined using Rayleigh-Gans-Debye light scattering theory with the appropriate factor for spherical shells, in agreement with the treatment of Chong C. S. and Colbow, K. (1976)<sup>24</sup>.

The data obtained was evaluated over a range of metal chlorides, polynucleotides and lipid concentrations. A total of 6 turbidity measurements per each temperature mentioned was performed and the plotted results were averaged. However, instead of using the stability ratio, *W*, for description of aggregation rates, in terms of Smoluchowski theory, we used another parameter ( $\alpha$ ), solely for comparative purposes with other works on phospholipid-inorganic metal cation-DNA ternary complexes<sup>27</sup>.

The physical parameter  $\alpha$  was proposed originally by Dr. V. Budker (Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of The ex-Soviet Academy of Sciences-Novosibirsk) and used as a constant to determine the degree of aggregation and adhesion of phospholipid vesicles with poly(ribo)nucleotides with or without metal cations<sup>27</sup>, as the ratio:

$$\alpha = \frac{A_{\text{polynucleotides-Mg}^{2+} \text{- lipid vesicles}}}{A_{\text{polynucleotides-lipid vesicles}}}$$

where *A* is the apparent absorption. This is therefore a ratio of absorbance values measured after addition of divalent metal cations to that before complexation with inorganic cations.

#### Differential Scanning Calorimetry

Calorimetric measurements were performed using Privalov type high sensitivity differential adiabatic scanning microcalorimeter DASM-4 (Biopribor, Pushchino, Russia) with sensitivity higher than 4.10<sup>-6</sup> cal K<sup>-1</sup> and a noise level less than 5.10<sup>-7</sup> W<sup>28</sup>. Heating runs were performed with a scan rate of 0.5 K/min. The temperature at the maximum of the excess heat capacity curve was taken as the transition temperature *T<sub>m</sub>* and the transition width  $\Delta T_{1/2}$  was determined at the transition half-height. The specific heat capacity of the lipids *C<sub>p</sub>(lip)(T)* was calculated from the relationship<sup>21</sup>:

$$C_{p\text{lip}}(T) = \frac{C_{p, \text{app water}}(T)}{V_{\text{app water}}(T)} \cdot V_{\text{app lip}}(T) - \frac{\Delta C_{p, \text{obs}}(T)}{m_{\text{lip}}}$$

where *C<sub>p, app water</sub>(T)* and *V<sub>app water</sub>(T)* are the apparent specific heat capacity and volume of water taken from Handbook of Chemistry and Physics, 66th Edn. (1985-86),  $\Delta C_{p, \text{obs}}(T)$  is the observed difference in heat capacity between the lipids and the water baseline, *V<sub>app lip</sub>(T)* is the apparent specific volume of lipid and is given by published densitometric values, and *m<sub>lip</sub>* is the mass of the employed lipid. The calorimetric enthalpy  $\Delta H_{\text{cal}}$  of the transition was determined as the area under the excess heat capacity curve. The van't Hoff enthalpy  $\Delta H^{\text{vH}}$  was calculated from the calorimetric data by using the relationship<sup>21</sup>:

$$\Delta H^{\text{vH}} = 4RT^2 C_{p}^{\text{max}} / \Delta H_{\text{cal}}$$

where *C<sub>pmax</sub>* is the maximum excess heat capacity.

Care was taken to ensure the reproducibility of the obtained result in terms of instrumental drift. For this, microcalorimetric measurements of melting behaviour of lipids in complex with poly(A:U)<sub>n</sub> and calf thymus DNA in various lipid/DNA ratios were carried out using another instrument (SETARAM DSC microcalorimeter, Caluire, France), equipped with Hewlett-Packard PC and with company supplied computer programme. Scanning rate of 0.5 or 1.0°C/min and scanning range between 17°C and 95°C was used throughout measurements. Amplification range was 0.250 mV with 1500 points.

## RESULTS AND DISCUSSION

The design of nucleic acid delivery formulations currently proceeds as searches of alternatives to highly risky viral vectors. In this context, the emphasis is put more on formulating more effective delivery systems rather than on engineering therapeutic genes, which itself will take many years, indicating the fact that gene therapy is a high risk commercially. The objective of liposomal delivery of nucleic acids is to achieve compaction of

genetic material within highly restricted lipid compartments, while decreasing its toxicity. Hence, the stability and physical properties of DNA within the lipid surrounding is of major concern.

These characteristics of nucleic acids are well documented in various model membrane systems, such as Langmuir-Blodgett (LB) films, black lipid membranes (BLM) and liposomes. While the first two methods provide evidence for surface adsorption and penetration of DNA through lipid mono- and bilayers, liposomes are preferred subject due to their oval form thus approaching three-dimensionally the cell shapes.

The possibility of creating a variety of sizes, electrostatic and hydrophobic forces and therefore controlling vesicle curvatures are few factors making liposomes attractive as gene delivery carriers. Since, the stability of the liposome-nucleic acid formulations is detrimental factor for subsequent cellular studies, the first contacts between nucleic acids and lipids, namely, adhesion, aggregation of DNA onto liposomes, and energetics of cation-induced complex formation between these biopolymers, are emphasized.

The present work describes preliminary measurements on poly(ribo)nucleotide-zwitterionic liposome self-assembly formation as a possible alternative of the currently employed problematic cationic lipids in gene delivery. The results on coplexation between DPPC-MLV and ULV and polynucleotides in the presence of Mg<sup>2+</sup> are presented for brevity. Comparisons with DMPC and Ca<sup>2+</sup> are mentioned as well.

The majority of studies on lipid vesicles' aggregation deal with well-established electrostatic reasoning on inorganic cation effects on negatively charged lipids. Few works devoted to cation binding to neutral phospholipids report difficulties with determinations of the rate constants, especially when varying temperature. Overcoming the discrepancy of the reported rate constants is a prerequisite for verifying the existing mechanistic theories.

In this, study, we seek particularly to test the concept of a hydration forces as an explanation of the observed complexations. The aggregation of liposomes with polynucleotides and larger DNAs in the presence of Mg<sup>2+</sup> can be observed by optical microscopy. However, applying spectroscopic measurements have the following advantages. Light scattering methods have been widely used in liposome research, to determine shapes and sizes of phospholipid dispersions<sup>24,25</sup>.

The theory of light scattering and turbidity methods as applied for observation of thermotropic phase transitions in both natural and artificial membranes is given by Chong, C. S. and Colbow, K. (1976)<sup>24</sup>. The application of UV/VIS spectroscopy, used also in the current study, in gene delivery studies was recently reviewed<sup>29</sup>.

Briefly, in comparison with electron microscopy, the use of light scattering measurements is more suitable, since the system can be observed without large perturbations, while the sizes and shapes of vesicles visualized in electron micrographs often depend on the fixing or staining method employed, thus creating preparation artifacts. The scattered light can be observed at a right angle to the incident beam<sup>24,25</sup>. Turbidity ( $\tau$ ) is the decrease by scattering of the transmitted light, and thus is equal to the scattering over all angles.

Having also considered the above mentioned lack of angular dependence of liposomes, the preferred method is spectrophotometric measurement of the intensity of the transmitted beam instead of using light scattering changes.

Table 1. Values of  $\alpha$  parameter for multilamellar DPPC-Mg<sup>2+</sup>-poly(ribo)nucleotides ternary complexes at below and above T<sub>m</sub>

	DPPC-MLV			
	poly(A:U) <sub>n</sub>	poly(G:C) <sub>n</sub>	poly (C) <sub>n</sub>	Calf Thymus DNA
	<i>T=23 °C</i>			
Without Mg <sup>2+</sup>	1.16±0.004	1.18±0.003	1.11±0.005	0.8±0.003
Mg <sup>2+</sup>	1.18±0.003	1.19±0.06	1.13±0.006	0.008±0.4
	<i>T=55 °C</i>			
Without Mg <sup>2+</sup>	1.18±0.04	1.18±0.3	1.12±0.5	0.8±0.4
Mg <sup>2+</sup>	1.19±0.2	1.18±0.6	1.12±0.7	0.8±0.6



Table 2. Values of  $\alpha$  parameter for unilamellar DPPC-Mg<sup>2+</sup>-poly(ribo)nucleotides ternary complexes at below and above T<sub>m</sub>

	DPPC-ULV			
	poly(A:U) <sub>n</sub>	poly(G:C) <sub>n</sub>	poly (C) <sub>n</sub>	Calf Thymus DNA
	<i>T=23 °C</i>			
Without Mg <sup>2+</sup>	0.45±1.35	0.87±0.1	1.56±0.78	1.06±0.36
Mg <sup>2+</sup>	4.52±0.08	4.81±0.14	1.86±0.13	1.56±0.3
	<i>T=55 °C</i>			
Without Mg <sup>2+</sup>	1.02±1.59	0.72±1.37	1.04±1.23	0.67±0.67
Mg <sup>2+</sup>	2.82±0.08	13.25±1.37	1.25±1.26	0.87±0.36

Table 3. Determined  $\alpha$  parameters for lipid-DNA Complexations with various divalent metal cations

$\alpha$	Divalent Metal Cations								
	<i>Mn</i>	<i>Mg</i>	<i>Ca</i>	<i>Co</i>	<i>Ni</i>	<i>Sr</i>	<i>Zn</i>	<i>Fe</i>	<i>Ba</i>
<i>DNA</i>	3.9	3.7	3.7	3.6	3.4	3.0	2.7	2.6	1.2

The complexations between poly(ribo)nucleotides with different conformation and neutral phosphatidylcholine vesicles were studied with emphasis on the kinetics of the associations. Fig.2 shows the turbidity changes of their ternary associations with divalent metal cations. No any turbidity was detected in poly(ribo)nucleotide samples in the absence of metal cations.

As seen, their associations with liposome vesicles do not lead to any turbidity change as well. After addition of metals and rapidly mixing of the cuvette content, a substantial increase of turbidity of the suspension is seen, indicating the formation of larger aggregates. Ca<sup>2+</sup>-induced aggregation between polynucleotide helix and liposomes is slightly higher as compared to Mg<sup>2+</sup>. The physical parameter  $\alpha$  was used as a criteria for evaluation of the ternary complex formation of these biopolymers (Table 1 and 2). MLVs showed no any turbidity increase in the presence of metal cations. Turbidity changes were observed only with ULVs.

This result suggests that interlamellar repulsive forces are stronger than the exerted effect of the inorganic cations. This is an example of the influence of cation strength and valency on the structure and size of collapsed DNA. Apparently, this complexation type is valency-dependent, the effect being stronger in the case of at least three positive charges on it. The formed toroidal DNA molecule is more affected than lipids. This DNA aggregates with several MLVs, with very little tendency to penetrate at least partly to their intramolecular spaces (Fig.5).

The chosen poly(ribo)nucleotides and calf thymus DNA permit testing the effect of chain conformation on complexation pattern. Interestingly, the single-stranded polycytidylic acid showed different complexation behaviour, when taken in various concentrations. Thus, when used in doubled concentration, this homopolynucleotide showed the greatest value of the  $\alpha$  parameter.

The effect is due to the base-stacking properties of poly(C)<sub>n</sub> when taken in high amounts<sup>30</sup>. This is a case of complexation occurring without vesicles' aggregation and the  $\alpha$  parameter remains constant, indicating a possible adhesion of this synthetic poly(ribo)nucleotide onto the vesicle surface. On the other hand, poly(G:C)<sub>n</sub> showed higher value of  $\alpha$  parameter, as compared to poly(A:U)<sub>n</sub>, indicating the effect of H-bond effect. Thus, the observed aggregation trend of poly(ribo)nucleotides was:

$$\alpha_{\text{poly(C)}_n} \sim \alpha_{\text{calf thymus DNA}} < \alpha_{\text{poly(A:U)}_n} < \alpha_{\text{poly(G:C)}_n}$$

and is essentially concentration-dependent. This complexation behaviour is maintained both below and above phase-transition temperature of the lipids. Parallel experiments with closely related lipid DMPC showed the same trend. DMPC and DPPC differ only slightly in structure, but have different  $T_m$ . Thus, DMPC possess greater fluidity than DPPC. The fluidity of lipids, however, did not affect the complexation pattern of the ternary associations (Table 1 and 2).

Table 3 is a compilation of previously published  $\alpha$ -parameters and shows the affinity of binding to various inorganic cations. The obtained values are highly depending on method of preparation of liposomes and on the nucleic acid type and concentration. Our presented results are obtained with preferred and reliable extrusion method of ULV preparation, creating a homogeneous vesicle suspension.

The observed size-dependent lipid-DNA interactions are in agreement with previous studies on certain plasmids and calf thymus DNA<sup>31</sup>. Thus, the kinetics of aggregation of larger nucleic acid with vesicles is slower than in the case of smaller polynucleotides. However, in addition to this data confirmation, our current study showed that the complexation is dependent on polynucleotide chain conformation.

With regard to metal cation specificity, comparison with Table 3 shows the same behaviour of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ , irrelevant of preparative details. The effect of  $Ca^{2+}$  is comparable to that of  $Mg^{2+}$ . The slightly more efficient capacity of ternary complex formation of  $Ca^{2+}$ , compared to  $Mg^{2+}$ , is due to variations arising from different ionic radius effects. Apparently, hydrophobic and electrostatic interactions, as well as the structural amphiphilicity of the bilayers govern the polynucleotide-liposome self-associations.

The values obtained for  $\alpha$  parameter are in good correlation with binding constants of divalent metal cations with phosphatidylcholines, the affinity of binding to which decreases in the order:  $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$ <sup>27</sup>. In comparison, the preferred nucleic acid interaction with metals via phosphate oxygen atoms indicate major thermodynamic metal on coordination sites. Thus, the affinity for base relative to phosphate increases in the order:  $Li^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+} >$  trivalent lanthanides<sup>30</sup>. Raman spectroscopic investigation of calf thymus DNA, employed also herein, provide evidence for the following order of ionic perturbations on nucleic acid duplex:  $DNA < Sr^{2+} < Ba^{2+} < Mg^{2+} < Ca^{2+} < Mn^{2+} < Ni^{2+} < Cd^{2+}$ <sup>32</sup>.

Hence, there is obvious temperature-dependent difference between alkaline earth- and transition metal-DNA complexes. Since, the observed trend is a function of double- or single-stranded DNA, polynucleotides with these conformations were examined in the current study. Interestingly, regarding the affinity for complex formation with neutral lipids and polynucleotides  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  are intermediate between other alkaline earth and transition metal associations.

The ternary complex was destroyed by treatment with 10 mM EDTA, in agreement with V. V. Kuvitchkin and A. G. Sukhomudrenko (1987)<sup>27</sup>. Apparently, the divalent cations act as salt linkages between phosphate moieties of lipids and poly(ribo)nucleotides and form the ternary complex poly(ribo)nucleotide-divalent metal cation-phospholipid vesicles.

The presented turbidimetric data (Fig.2, Tables 1 and 2) showed that interaction of DNA with lipid vesicles in the presence of divalent metal cations is characterized by increased turbidity of the system, resulting from the liposome aggregations and fusions<sup>33</sup>. Thus, decrease in turbidity at lower temperatures (approx. 37° C) is probably due to phase transition of small vesicles and a decrease at about 44 ° C with larger vesicles or multilayer.

An increase of turbidity between 38 ° C and 43 ° C is attributed to the fusion of small vesicles. The turbidity changes were interpreted for various modes of vesicle preparation to confirm the reproducibility of the turbidimetric measurements.

This is essentially temperature-dependent process, as proved originally by E. E. Bichenkov *et al.* (1988)<sup>34</sup>, creating difficulties in UV/VIS registration of DNA-melting pattern. Microcalorimetric measurements were performed to distinguish between conformation-dependent modes of complexation. Fig.3 depicts DSC heating scans of binary complexes between poly(ribo)nucleotides and calf thymus DNA with DPPC-MLV in the presence of  $Mg^{2+}$ .  $Mg^{2+}$ -ions affects slightly the apparent specific heat capacity ( $\Delta C_p$ ) (Fig.3 (1) vs. (3) and (4)).



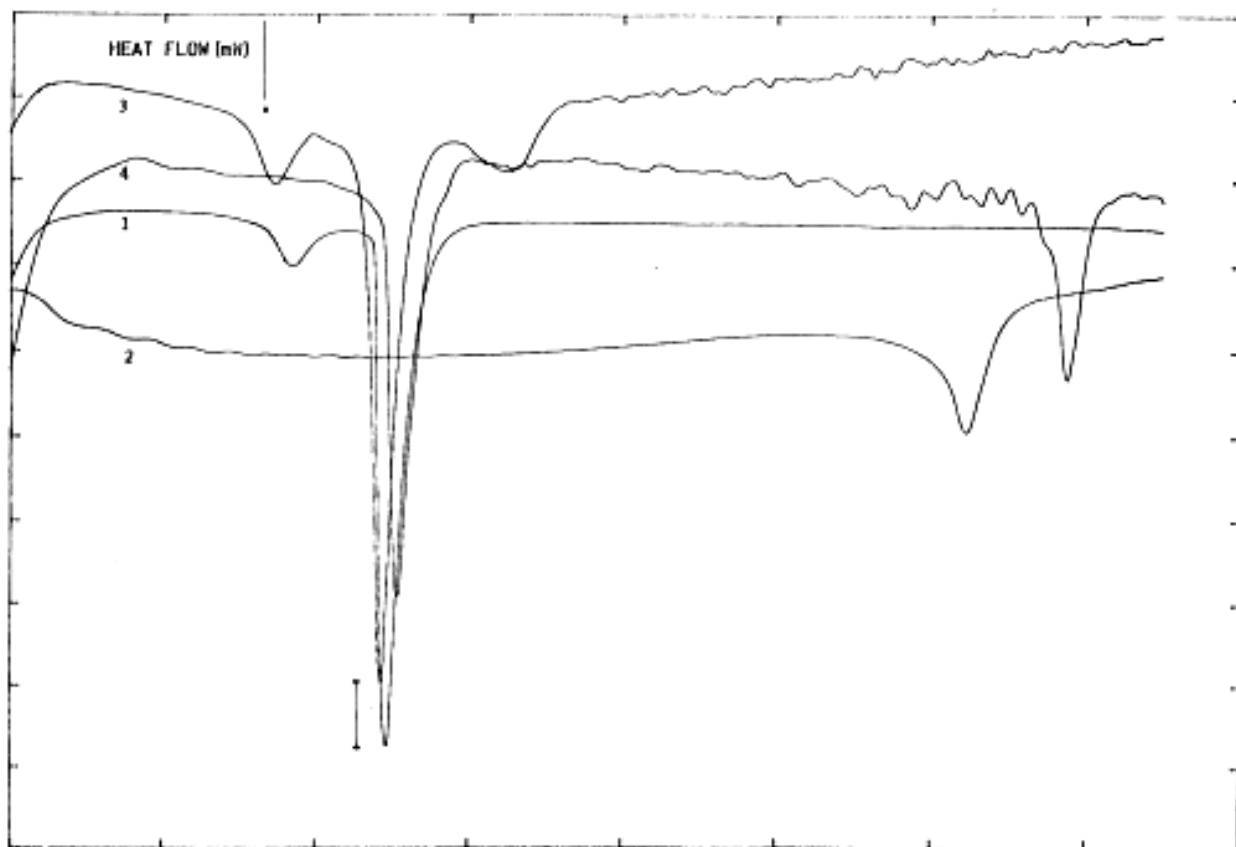


Fig. 3. Microcalorimetric phase behaviour of DPPC multilayers in the presence of poly(ribo)nucleotides and  $Mg^{2+}$ .  $\Delta C_p$  bar is  $0.5 \text{ J.K}^{-1}$ . Concentration of the synthetic biopolymers were: 1 mM of (A):(U) bp of poly(A:U) duplex (Sigma), and 1 mM of DPPC (assuming average molecular mass of dimensionless 770) and DNA (assuming average molecular mass of base pair of 643 and molecular weight of calf thymus DNA of 1,800 kDa) in 10 mM HEPES/10 mM NaCl; pH=7.2, cell volume 1.5 ml. Differential scanning microcalorimetric measurements were performed using SETARAM DSC microcalorimeter, equipped with Hewlett-Packard PC and with company supplied computer programme. (1): DPPC-MLV+ $MgCl_2$ ; (2): poly(A:U)+ $MgCl_2$ ; (3): DPPC-MLV+poly(A:U)+ $MgCl_2$ ; (4): DPPC-MLV+calf thymus DNA.

Interestingly, the phase separation between DPPC-MLV and poly(A:U) (Fig.3(3)) indicates that interaction and stabilization of polynucleotide duplex occur even in the absence of bridging metal cations. This result is in agreement with Bichenkov *et al.* (1988)<sup>34</sup>.

The effect of polynucleotide chain length and conformation is more apparent. Thus, the apparent specific heat capacity is higher for poly(A:U)<sub>n</sub> compared to calf thymus DNA, indicating that nucleic acid melting behaviour is somewhat dependent on base composition (homopolymer vs heteroduplex) and sequence<sup>19</sup>.

These  $\Delta C_p$  values were further used for comparisons of the transition enthalpies,  $\Delta H$ , of different duplexes, which should be done for a common reference temperature,  $T_{ref}$ . This yields duplex transition enthalpies at  $T_{ref}$ ,  $\Delta H_{T_{ref}}$ , depending much less on duplex conformation, base composition or sequence<sup>19</sup>. Although close in magnitudes, the values  $\Delta C_p$  were different for various duplexes and are functions of temperature and salt concentration. Such changes in adiabatic compressibility in biopolymer transitions can be expressed as the sum of intrinsic and hydration contributions<sup>19</sup>.

Fig.4 indicates that  $T_m$  value of DPPC-MLV increases upon ternary complex formation with calf thymus DNA driven by  $Mg^{2+}$  from  $41.68^\circ\text{C}$  to  $44.24^\circ\text{C}$ . In order to unravel further details of ternary complex formation, the above mentioned melting behaviour of zwitterionic lipids in the presence of DNA and  $Mg^{2+}$  was followed with ULV. Adiabatic differential scanning microcalorimetry (DASM-4) was used solely for comparative purposes in terms of instrumental drift (Fig.3 and Fig.4). Since, the peaks are observed closely to each other, only results with major transitions are shown for convenience.

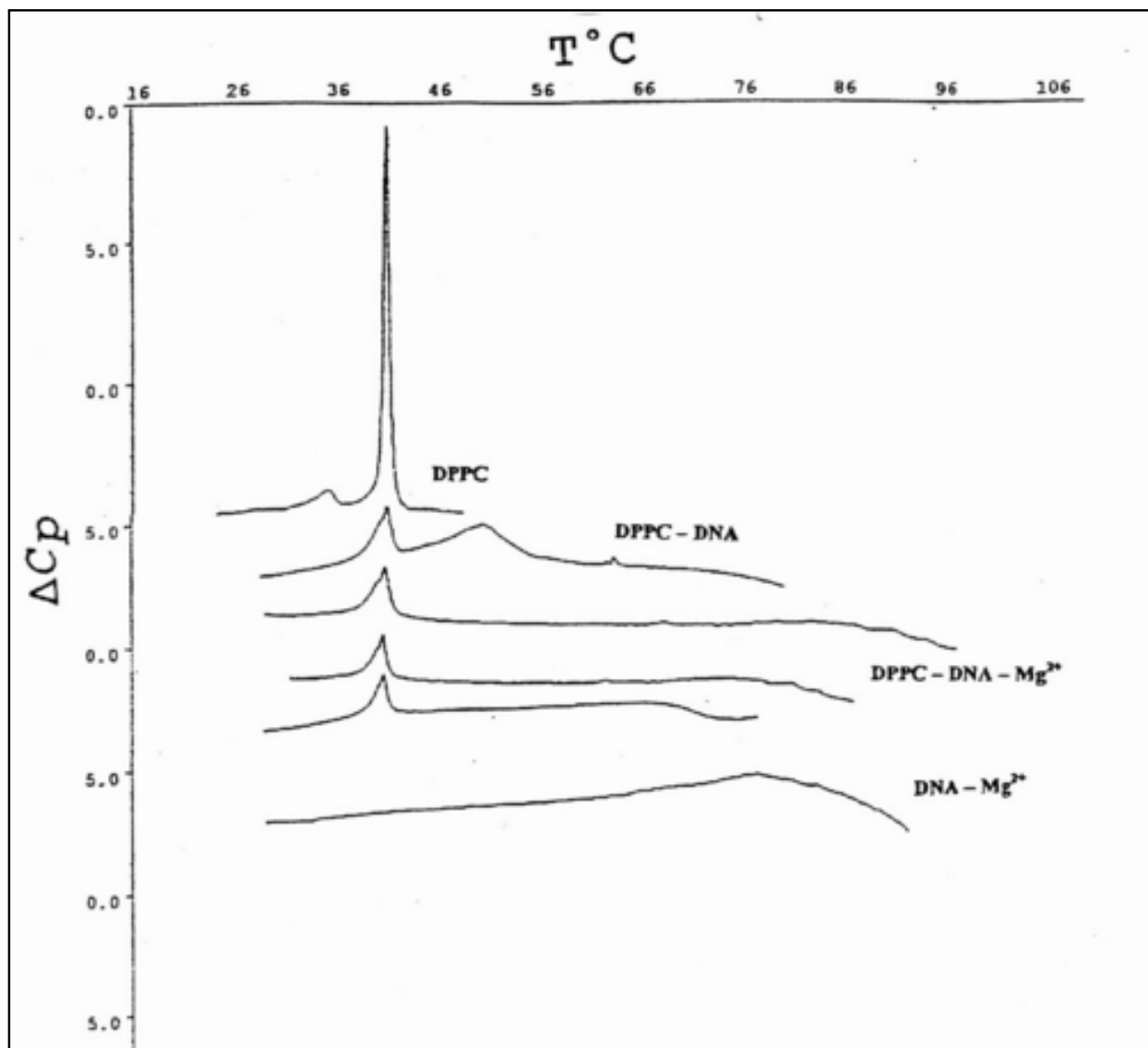


Fig.4. DSC heating scans of the main phase transition of DPPC multilayers and unilamellar vesicles obtained from them, upon their associations with various amounts of calf thymus DNA and 0.5 mM  $Mg^{2+}$ . Each complex is denoted in the abbreviated form. Data is presented as excess apparent heat capacity ( $\Delta C_p$ ) vs. temperature ( $T^\circ C$ ) curves. The thermograms are separated from each other at suitable distances for better representation. Details of sample preparation and measurements are outlined in Materials and Methods.

Fig.4 represents typical thermograms of DPPC liposomes and their ternary associations with calf thymus DNA and  $Mg^{2+}$ . The first curve at the top is a calibration mark and shows a characteristic DPPC multilayer phase transitions, with pre-transition temperature peak at around  $36^\circ C$  with  $\Delta H_{cal}=3.9$  kJ/mol and the gel-to-liquid crystal, or main-phase transition temperature at  $41.9^\circ C$ , in good agreement with the relevant database (LIPIDAT): <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>. Next curve is the change of lipid phase transitions after complex formation with DNA in the presence of  $Mg^{2+}$ .

DPPC-ULV's thermogram peak appears broader with a decreased maximum. The pre-transition disappears. This melting behaviour indicates that phase separation occurs between lipids, nucleic acid alone, and their complexes. Thus after, the first peak corresponding to DPPC-ULV at  $41.9^\circ C$ , a second peak appears at  $51.3^\circ C$  for the equimolar mixtures of lipids and DNA. A third minor peak corresponding to free and unbound DNA alone is seen at  $\sim 60^\circ C$ .

The observed peak distribution indicates that the fraction of liposome-free DNA is much less than that in the complex. The liposome-DNA association results in the significant decrease of the  $\Delta C_p$ . The third curve is a phase behaviour ULV- $Mg^{2+}$ -DNA at 1:1:1 molar ratio. Two peaks seen correspond to lipid phase and to lipid-DNA aggregate, respectively. The latter peak is attributed to the high temperature stabilization of the DNA secondary structure, by a tight packing of DNA molecules with several ULVs, bridged by  $Mg^{2+}$  (Fig. 4).

The observed association is governed by surface cationization of the vesicles, sensed by a conformational change in the choline group of DPPC. It tilts towards the bilayer surface plane since its positively charged quaternary nitrogen is attracted by the opposite charge of the nucleic acid.

The ternary complex of DNA-metal ion-phosphatidylcholine vesicle remains stable at different incubation times, in agreement with small- and wide-angle X-ray scattering measurements<sup>20</sup>. Apparently,  $Mg^{2+}$  decrease the DNA-effective radii and create groove narrowing. This is accomplished by ligand binding to six or eight water molecules, or alternatively, to the phosphate of the nucleic acid in the minor groove in a fully hydrated state<sup>35</sup>.

The last curve at the bottom represents the equimolar mixture of DNA and  $Mg^{2+}$  and DNA, which brings about a major signal at  $-90^{\circ}C$ . The  $Mg^{2+}$ -ions at the equimolar amounts with DNA increases the  $T_m$  value by  $33.7^{\circ}C$ , due to  $Mg^{2+}$ -induced duplex stabilization. ULVs treated with the same  $Mg^{2+}$  concentration did not produce such a shift, which is normally detected spectroscopically (Fig. 4).

The figure depicts the effect of inorganic cations on phase transitions. Such binary polyelectrolyte associations comprising the interest in metal ion-phospholipid complexes has arisen from studies on ion fluxes through cell membranes and their quantitative descriptions with link to relevant functional implications. Most of the biomembranes are bilayers in appearance. Ions affect aggregation properties of the amphiphiles and thus their phase transitions<sup>36</sup>. Since their surroundings are salty biological fluids, laboratory data obtained for inorganic ion effects on artificial lipid bilayers can be extrapolated to biological membranes.

Besides their well-documented physicochemical parameters, biologically active  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  were chosen in the present study herein for approaching the currently available electrostatic theories for self-assemblies in aqueous media<sup>37</sup>. Metal ion binding to oppositely charged amphiphiles is well-documented. On the other hand, cation binding to zwitterionic lipids is less known. Currently, difficulties exist in interpretations of the estimated stoichiometry of cation-phospholipid interactions, as well as issues concerning the determinations of their binding constants and binding energies<sup>36</sup>. Therefore, our experimental design could give further evidence for the mechanism of metal ion-mediated supramolecular self-assembly formations.

The relevant signal indicating ion effect on lipid phase transitions was not seen. Such effect is usually reported by other authors<sup>18,38</sup>. As oppose to this results, the turbidity measurements indicated depicted this effect more clearly (Fig.5). The observed discrepancy indicates the need for coupling the calorimetric free energy estimates with one or more spectroscopic or microscopy techniques.

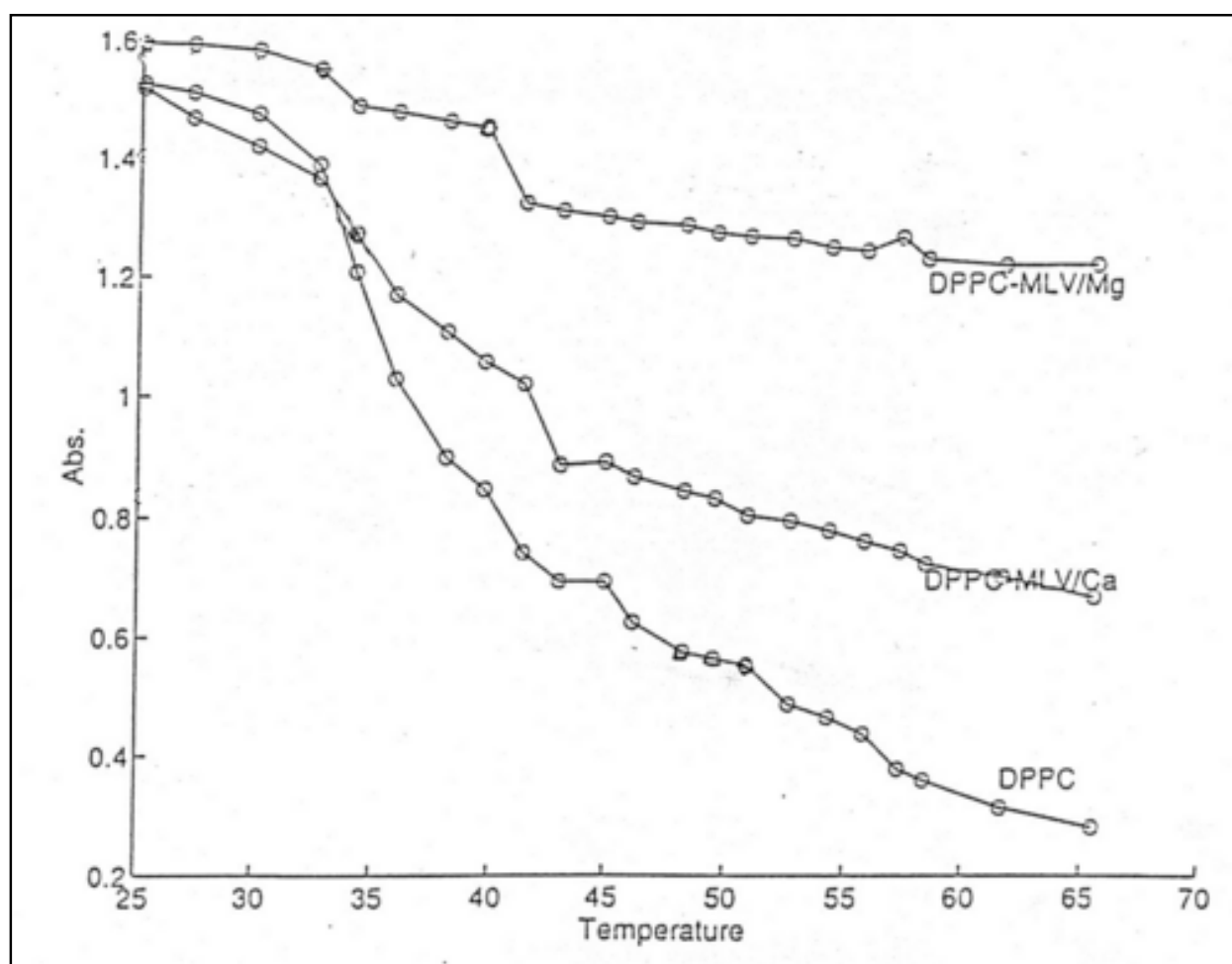


Fig.5. The effect of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  on phase transitions of DPPC multilamellar dispersions. The main phase transition temperature of the lipids is shifted towards higher values. Thermotropic phase behaviour of lipids is presented as measurements of the change in

*optical density at the constant rate ( $2\pm 0.2^\circ\text{C}$ ) as a function of temperature. Values were recorded by stepwise increasing the temperature using 3 ml quartz cuvettes thermostated within  $\pm 0.3^\circ\text{C}$  by circulating water bath connected to the cuvette holder, as described in Materials and Methods. Recordings were performed after maintenance of the sample in the cuvette holder for 5 minutes at each temperature. Data is presented as a mean  $\pm$  S.D. of 6 measurements, and plotted using MATLAB<sup>®</sup> software.*

More specifically, in our opinion, the use of isothermal titration calorimetry and surface plasmon resonance is a reasonable option. Since addition of EDTA diminishes the aggregation parameter of polynucleotide-divalent metal cation-DPPC mixtures in both DPPC MLV and ULV cases, obviously  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  affect the structure of water bathing the lipid aggregates. This is a function of the buffer and ionic strength conditions employed. Therefore, hydrophobic interactions become important, since addition of divalent cation changes the structure of the water. Such bound water exerts effects on the hydrophobic term of the free energy of the lipid aggregation and thus the lipid phase transitions as well.

When limited hydration is used, such inorganic cations influence osmotically the lipid aggregates, by competing with them for water of hydration. Hence, the effective number of water molecules available for amphiphile hydration is reduced. Thus, the osmotically driven lipid dehydration influences the lipids by increasing their phase transition temperature. Compared with this indirect effect of metal cations on water structure and their distributions around the polyelectrolytes engaged in self-assembly formation, binding of these ions to charged phospholipids act by inducing lipid crystallizations, which raises the lipid  $T_m$ <sup>36</sup>.

In this context, experimental efforts have been devoted to the mode of binding and its effects on order-disorder temperature shifts of phosphatidylcholines. Neutron diffraction study revealed the particular effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on structure of DPPC membranes in both solid and fluid lamellar phases, in terms of Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory<sup>39</sup>.

Apparently, temperature-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  adsorption on the surface of the lipids induces electrostatic repulsion, which are equilibrated by van der Waals attraction forces, as deduced from calculations of Gouy-Chapman-Stern theory using the binding parameters of to DPPC. FTIR analysis showed hydrated vs dehydrated media effects upon metal cation binding to *ap* rotamers of  $\alpha_4$  of DPPC choline group<sup>40</sup>. The described conformational effect on the choline head group is in agreement with 2H-NMR measurements<sup>41</sup>.

The reported scan at Fig.4 is a reproducible measurement of Fig.3, indicating a lack of instrumental drifts. The results were confirmed in Tris-HCL, HEPES and SSC buffers (data not shown). Obviously, divalent metal cations did not contribute to the stabilization of the ternary complex towards higher temperatures. While the latter effect is attributed in this case to polynucleotide chain, apparently  $\text{Mg}^{2+}$  creates polymorphic phase transitions in the phospholipid moiety.

The metal ion binding properties are similar for both low molecular weight polyribonucleotides (Fig.3) and high molecular weight calf thymus DNA (Fig.4). Thus, in both cases close stability constants have been observed. This is considered as indication that several divalent metal cations are bound with outer sphere coordination. Depending on particular type of the cation, this model considers a water molecule between the metal ion and the phosphate oxygens.

Extending further this case from polynucleotides to larger nucleic acids requires referring to  $\text{Mg}^{2+}$  *hard* or *class* a metal ion properties. Among biologically relevant divalent cations, the hardness of  $\text{Mg}^{2+}$  (32.55 eV) is lower than the value for the hardest metal  $\text{Be}^{2+}$  (67.84 eV), but superior to  $\text{Ca}^{2+}$  (19.52 eV),  $\text{Zn}^{2+}$  (10.88 eV),  $\text{Cu}^{2+}$  (8.27 eV) and  $\text{Fe}^{2+}$  (7.24 eV)<sup>42</sup>.

In an attempt to understand the cation-water interaction at the first and second level of hydration, and carrying the *ab initio* Hartree Fock, Density Functional Theory (DFT) and reaction field methods, the latter study indicates that a magnesium crystalhydrate in complex with 6 water molecules possess a significant difference in relation with intermolecular movements, as seen from its vibrational spectra.

The entropy contributions could stabilize this hexahydrated form of  $\text{Mg}^{2+}$ . Within this respect  $\text{Mg}^{2+}$  prefer to bind to the *hard* oxygen sites of the phosphate groups of nucleic acids. This phosphate-binding stability is favoured by the decrease in solvent polarity. In this property,  $\text{Mg}^{2+}$  is more efficient compared with monovalent ions.

This seems to be due both to the counterion condensation and residual ion atmosphere screening for divalent relative to univalent cations, as well as to the  $\text{Mg}^{2+}$  ions complexation to phosphates in ds DNA<sup>30</sup>.  $\text{Mg}^{2+}$  raises the structural stability of the nucleic acid by affecting the helix-coil transition temperature of the duplex, due to partial neutralization of charges of phosphate groups with each other. The purine N7 positions are the most nucleophilic and form the preferred negative patches for ion binding, reflecting the trend for coordination with the softer donor ligand. The effect is governed by both thermodynamic and kinetic factors<sup>43</sup>.

In general,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  affect order-disorder properties of DPPC in a similar way, i.e., the stability of complexes formed increases with increasing ligand charge. Usually obtained small enthalpies indicate mainly entropy driven associations. Despite the general belief for similar action of these ions,  $\text{Mg}^{2+}$  was seen to be much more effective in aggregation of the ternary complexes presented in the current study. This effect is explained in terms of the current view on  $\text{Mg}^{2+}$  vs  $\text{Ca}^{2+}$  chemistries.

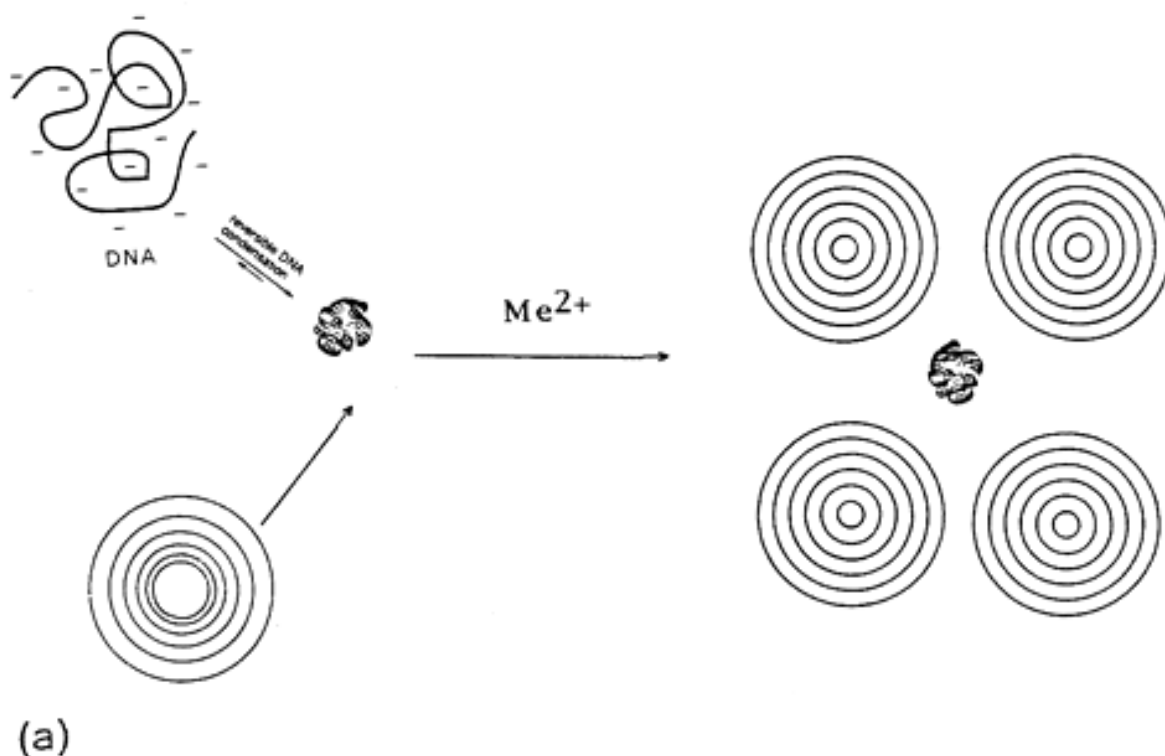
The above mentioned ionic radius reasoning ( $\text{Mg}^{2+}$ , 0.6 Å;  $\text{Ca}^{2+}$  0.95 Å) governs the differences in structure, ligand binding affinity, and reaction kinetics<sup>18</sup>. The kinetic differences presented for these two ions, are due to packing effects rather than due to total bond energy. In terms of octahedral surrounding of donors of oxygen atoms, this implies that bond distance of Mg-O being close to  $2.05 \pm 0.05 \text{ \AA}$ , is in contrast with the irregular coordination geometry, bond angle and distance, as well as coordination number for the larger  $\text{Ca}^{2+}$  ions. The  $\text{Mg}^{2+}$  octahedron is not easily broken. Thus, the central field of  $\text{Mg}^{2+}$  dominates the coordination sphere.

With regard to crowding effects, the stability constants for  $\text{Ca}^{2+}$  exceeds those for  $\text{Mg}^{2+}$ . This forms the basis of the differences in complex formation of these two ions. Hence, steric and  $pK_a$  factors determine the strong associations of  $\text{Mg}^{2+}$  and in the case of its complexes with nucleic acids, much of its coordination sphere is made up from water molecules<sup>18,44</sup>.  $\text{Mg}^{2+}$  has more profound tendency for binding to nitrogen donors, as oppose to  $\text{Ca}^{2+}$ .

The slow exclusion of  $\text{Mg}^{2+}$  permits its dominating role over  $\text{Ca}^{2+}$  in charge neutralizations in cellular cytoplasm. In this respect, using differences in size, biosystems remove more easily  $\text{Ca}^{2+}$  than  $\text{Mg}^{2+}$  from the cytoplasm, indicating the prevailing role of the latter in polyelectrolyte complexations.

The structure of the interacting biopolymers in lipoplex formulations is a matter of controversy. Research evidence indicates that both DNA<sup>45</sup> and lipids<sup>46</sup> affects each other's structural transitions during complex formation. Most of the interpretations for this self-assembly in terms of well-established polyelectrolyte theories for interactions between oppositely charged macromolecules is an oversimplified view of the real structures.

It is likely that structures similar to cationic lipid-DNA complexes are formed<sup>47,48</sup>. In our opinion, kinetic vs. thermodynamic stability features govern this self-association in more complex way. Within this respect, the model considers the lipid-DNA structures as overlaying layers of DNA adsorbed onto lipid bilayers, after charge neutralization (Fig.6).





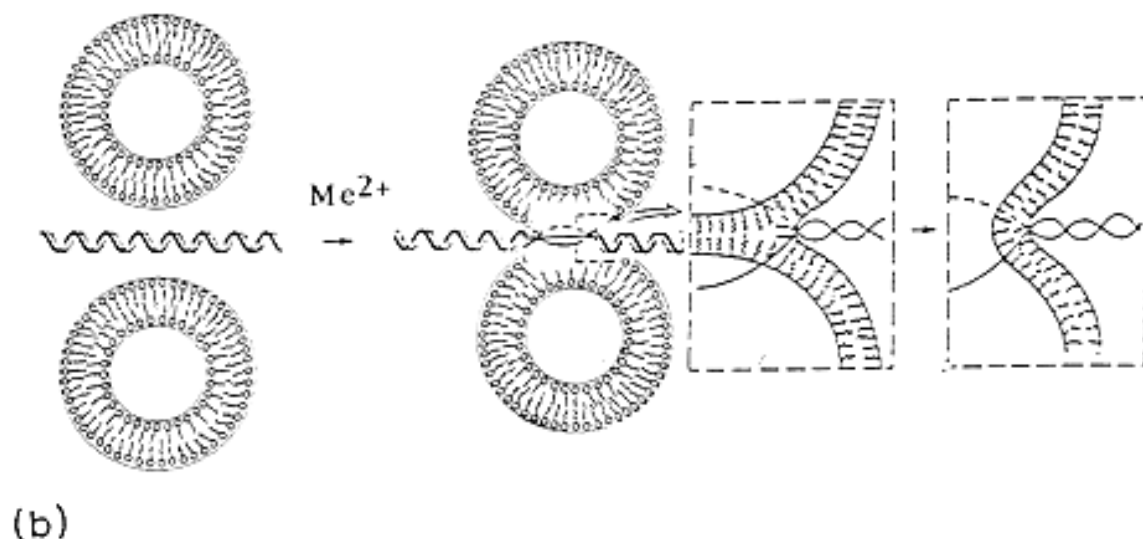


Fig. 6. Divalent metal cation bridged zwitterionic multilamellar (a) and unilamellar (b) vesicle-nucleic acid aggregation and fusion.  $Me^{2+}$  refers to inorganic divalent metal cations.

The process is governed by adsorbed cations ( $Me^{2+}$ ) on the surface of the zwitterionic lipids. The presence of such multilayers of alternating lipid-DNA assemblies is due to formation of condensed DNA as parallel arrangements between the lipid bilayers<sup>49</sup>. This is expected, due to the existence of 3-D correlation forces between the DNA-covered lipid layers, following DNA-driven formation of multilamellar liposomes from ULVs.

Thermodynamic measurements reported in Fig.3 and 4, represent probably several intermediary structures<sup>50</sup>. In this self-assembly, first the electrostatically controlled formation of lipid-DNA structures is expected. Metal cation-induced DNA condensation and compaction attracts liposome tetramers. In this structure, the accumulated positive charge densities of the liposomes would probably cause the closely situated liposomes to repel each other and dissociate from the nucleic acid. This represents a case of complexation between DNA with several MLVs assembled as grapes around  $Mg^{2+}$ -induced compacted, branched DNA molecules (Fig.6a).

The case with ULVs is similar, but the nucleic acid helix is shown as a linear chain (Fig.6b) for representation purposes-for better appreciation of DNA-induced liposome fusion leading to generation of liposome, with higher curvature, which is advantageous for further increasing the transfection efficiency.

Another possibility could be a lipoplex, in which DNA is encapsulated within the liposome. This model considers the fact that divalent cations could be evenly distributed on both outer and inner bilayer leaflets. Hence, most probably, the DNA may be attached to inner membrane rather than moving free in the central aqueous core.

A third model could be DNA surrounded on both sides by lipid leaflets, thus forming a multilayers of lipid-DNA arrangements. This could happen as a result of the nucleic acid entrapment between the lipid bilayer during liposome fusion, which would bring the bilayers in close contact zone. This is a highly probable structure, which is essentially a DNA-driven process.

Alternatively, no any liposome is formed at all, but instead the DNA is coated with lipid pieces during preparation. Yet another possibility is the transient structure, in which DNA passes through the bilayer to interact with positive charges on the inner and outer leaflets of the bilayer.

In such a bilayer traversal, the DNA would be capable of acting as a fusogenic agent, by causing both aggregation and fusion of the vesicles. Since MLVs are highly resistant to nucleic acid penetration, Fig.6b comprises the most probable structure with ULVs. In our opinion, co-existence of several of these lipid-DNA self-assemblies is also possible, perhaps in a dynamic equilibrium. Since the pre-formed liposomes were used in the present study, to which DNA is added, the nucleic acid is likely to be adsorbed onto the outside of the vesicle and may act as a fusogenic agent, bringing liposomes in close proximity and causing its own encapsulation in a larger vesicle.

Whether this is the end result, or the last mixture leads to formation of MLVs, with little use in transfection depends on size and conformation of the nucleic acid, on the method of preparation of lipoplexes. It seems, however, that DNA size does not contribute to stability of lipid-DNA self-associations, but rather to efficiency of

gene delivery.

Despite the lack of ideal model concerning the structure of the DNA within the lipid surroundings, a local unwinding depicted at Fig.6b is likely to occur, since a significant disruption of the planar interactions between the bases provide the direct explanation for the characteristic shifts in spectroscopic signals<sup>51</sup>.

The process is hydrophobically and electrostatically controlled, since liposomes aggregate and fuse in the presence of oppositely charged particles<sup>52</sup>. In the currently presented system, zwitterionic liposomes fuse in the presence of  $Mg^{2+}$ . Hence, polyanions like DNA play an active role in adhesion, aggregation and fusion, by bridging two liposomes in close contact, with surface adsorbed metal cation-induced fusion. Since, a variety of possibilities exist regarding the structure of liposome-DNA formulations, it seems that, besides contributions due to charge neutralizations or relative lipid/DNA ratios, the absolute concentrations of the engaged system components play an additive role in thermodynamically preferred lipoplex structure formation.

The major problem with nucleic acid delivery employing liposomes as a therapeutic gene vector is efficient escape from the clearance by the reticuloendotelial system (RES)<sup>53,54,55,56</sup>. The immune response is due to accumulation of serum proteins on the liposome surface, resulting in rapid removal primarily by liver, spleen, lymph nodes, and lung tissue, the process being referred to as opsonization. Usually neutral multilamellar and unilamellar vesicles follow a slower clearance rate than negatively and positively charged MLVs. ULVs are characterized with longer residence time than MLVs<sup>54</sup>.

The unavoidable hurdle until now has been the final fate of liposome, which are engulfed by macrophages of the RES, via the lysosomal participation (Fig.1). Such fusion with lysosomes leads to destruction of liposomes through the action of phospholipases with subsequent release of vesicle's content. Hence, efficient strategies to overcome opsonization of lipid vesicles have been designed, thus developing the concept of liposome targeting to specific target cells and tissues.

Initially, conjugation of various polymers and other macromolecules for this purpose was highly cell type-dependent and ended with discouraging results. Therefore, besides the required knowledge on the influence of *in vivo* environment on both vesicle leakage and clearance rates searching for improvement of the specificity of cell and tissue recognition becomes essential. The objective is to deduce alternative route of successful gene delivery avoiding the receptor-mediated intake. With this respect, we have worked on electrostatic control of membrane destabilization.

Liposomally entrapped genes would mimic the efficient viruses, acting via membrane fusion with the target cell surface<sup>2,53</sup>. We have focused on divalent metal cations and their ability for electrostatic stereocomplex formation with both amphiphiles and nucleic acid duplexes. Metal cations therefore are able to form numerous amphiphilic or hydrophobic regions and thus can potentially actively participate in membrane destabilization.

Fig.6 shows the simplified mechanism of the proposed DNA-induced fusion of liposome with host cell membrane. The initial structure of the entrapped DNA within liposome interior is based on Fig.6b, originally described by V. V. Kuvitchkin and A. G. Sukhomudrenko (1987)<sup>27</sup>, whereby DNA aggregates several vesicles leading to fusion of ULVs, triggered by temperature-dependent polynucleotide chain melting. Thus, a structure with larger curvature is formed, which is advantageous in further cell fusion.

The employed divalent metal cations have net positive charge, are capable of aggregation to form larger multimers, and have membrane destabilizing properties. Based on these properties of the surface active compounds under study, it is proposed that similarly to cationic peptides<sup>53</sup>, an inorganic cation-mediated cell membrane destabilization occur. This event is based mostly on overall three-dimensional arrangements of polar and hydrophobic regions, rather than on secondary structural elements<sup>53,57</sup>. Thus, the DNA-triggered and metal cation-induced destabilization with further disruption of negatively charged cell membrane is governed by electrostatic and hydrophobic forces.

As shown on Fig.6, metal cations bring the neutral liposomes with the entrapped therapeutic gene in close proximity with polyanionic cell lipid surface. Since, this is a salt concentration-dependent event, apparently this indicates the effect of screening on the negatively charged phospholipid headgroups ending with their destabilization.

When optimal combination of surface electrostatic and hydrophobic, as well as structural amphiphilicity is reached, DNA-induced fusion between zwitterionic liposome and host cell membrane takes place<sup>58</sup> and Fig.7. The exact mechanism of DNA-exerted lipid fusion in the presence of metal cations is currently unknown. It could be suggested that, similarly to positively charged peptides<sup>53</sup>, the electrostatic screening of the inorganic cations' hydration shell compensates for the inter-vesicle repulsive forces. Once the opposing membranes are in close contact zone, the electrostatic and hydrophobic features of metal cation form a link between liposome



and cellular phospholipids with subsequent lipid mixing.

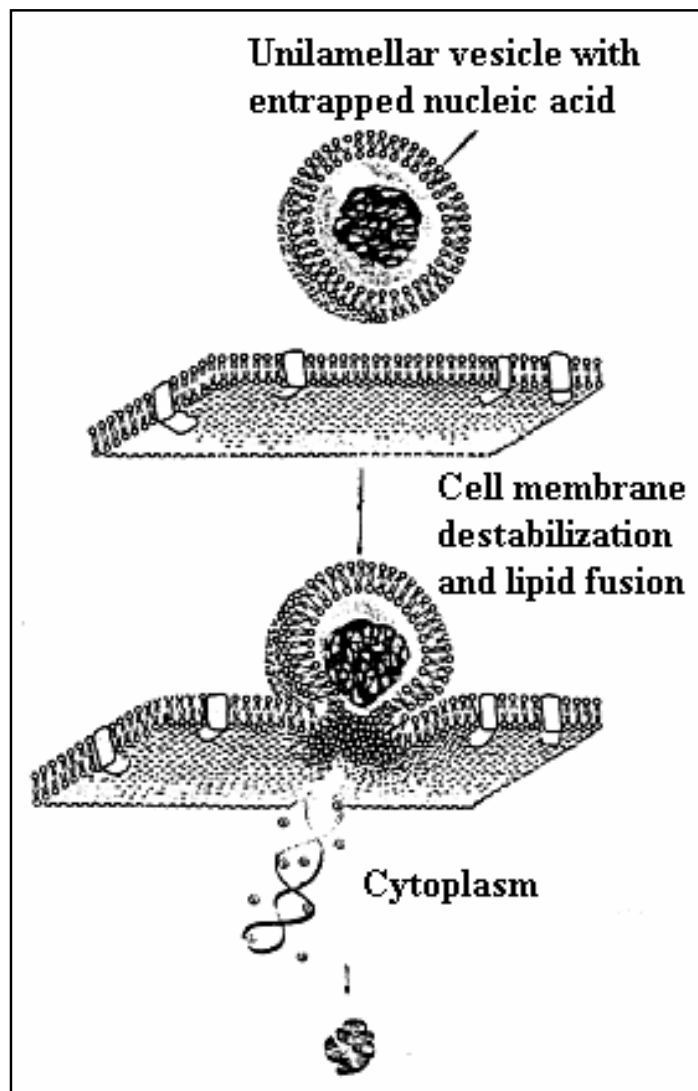


Fig. 7. Proposed mechanism for cellular internalization of divalent metal cation mediated DNA-induced zwitterionic lipoplex formulation.

This model is in agreement with original proposal of V. V. Kuvitchkin and A. G. Sukhomudrenko (1987)<sup>27</sup> (Fig. 5). Our proposal is supported by recent data of Sato *et al.* (2003)<sup>59</sup> on Mg<sup>2+</sup>-induced DNA attachment to phospholipids. However, more data is needed to clarify which lipid fusion intermediates are formed in the presence of melting DNA. Discussions concerning relevant implications of lipid fusion competent lipid vesicles of this sort remains speculative. One hurdle is the current uncertainty on the effect of lipid type and electrostatics in controlling fusion.

The presented work describes preliminary phase behaviour of simple synthetic phosphatidylcholines. Even though it is proposed as a possible experimental design, it seems too oversimplified for the *in vivo* situation. More specifically, the mechanisms by which the particularly employed lipid and its surface curvature with its various states of fluidity contributes to membrane destabilization is not understood at present<sup>54</sup>.

The encouraging item, however, is that liposomes normally could protect their nucleic acid content from enzymatic degradation, as deduced from routine EtBr electrophoretic pattern. Moreover, since this system possesses structural versatility, its transfection efficiency could be further improved by control of surface charge, size and lipid composition, besides other factors, together with plasmid vaccine<sup>54</sup>.

Neutral liposome-Mg<sup>2+</sup>-DNA formulations described herein are highly dynamic structures, thus frequently changing their pharmacological features. On the other hand, the ternary complex appears to be reproducible liposome-DNA formulation, but its serum stability is not yet well-defined. While promising results are reported recently on their employment<sup>60</sup>, more immunological experiments are needed for their *in vivo* evaluation.

Nevertheless, this preliminary thermodynamic study on the stability of neutral liposome-polynucleotide

nanostructures should contribute further to design and characterization of novel lipoplexes with improved transfection properties and thus for the development of better gene transfer systems for use in human gene therapy.

The concept of metal-based pharmaceuticals will open new insights for approaching the question of whether these artificial metal complexes follow the same principles in binding to their cellular receptors.

#### Acknowledgment

I thank Prof. R. I. Zhdanov (V. N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences) for introducing me to the topic of nucleic acid-membrane interactions and for his help as my postgraduate supervisor. The hospitality and close supervision of Prof. P. Bálgyay (J. A. Comenius University-Bratislava) and Dr. J. Bagelova (Institute of Experimental Physics, The Slovak Academy of Sciences-Košice) is greatly acknowledged.

#### REFERENCES

- 1.- Kabanov AV, Kabanov VA. DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjug Chem.* 1995; Jan-Feb;6(1): 7-20.
- 2.- Templeton NS. Developments in Liposomal Gene Delivery Systems. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2001; 1: 1-4.
- 3.- Liu F and Huang L. Development of Non-Viral Vectors for Systemic Gene Delivery. *J. Contr. Release* 2002; 78: 259-266.
- 4.- Templeton NS. Liposomal Delivery of Nucleic Acids *In Vivo*. *DNA Cell Biol.* 2002; 12: 857-867.
5. Templeton N S. *Gene and Cell Therapy-Therapeutic Mechanisms and Strategies*. 2nd Ed., Marcel Dekker, 2003.
- 6.- Miller D. The Problem with Cationic Liposome/Micelle-Based Non-Viral Vector Systems for Gene Therapy. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 1195-1211.
- 7.- Miller AD. Nonviral liposomes. *Methods Mol. Med.* 2004; 90: 107-38.
- 8.- de Gennes P-G. Problems of DNA entry into a cell. *Physica A*, 1999; 274: 1-7.
- 9.- Kootstra, NA and Verma IM. Gene therapy with viral vectors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 413-39.
- 10.- Gebhart CL and Kabanov AV. Evaluation of Polyplexes as Gene Transfer Agents. *J. Contr. Release.*, 2001; 73: 401-416.
- 11.- Anwer KB, Rhee G and Mendiratta SK. Recent Progress in Polymeric Gene Delivery Systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier. Syst.* 2003; 20(4): 249-293.
- 12.- Dass R. Cytotoxicity Issues Pertinent to Lipoplex-Mediated Gene Therapy *In-Vivo*. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002; 54: 593-601.
- 13.- Ulrich AS. Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. *Bioscience Rep.* 2002; 22, 2: 129-149.
- 14.- Vlassov VV, Balakireva LA and Yakubov LA. Transport of oligonucleotides across natural and model membranes, *Biochim Biophys Acta*, 1994; 1197: 95-108.
- 15.- Lambert G, Fattal E, and Couvreur P. Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. *Adv. Drug Del. Rev.* 2001; 47: 99-112.
- 16.- Kharakoz DP, Khusainova RS, Gorelov AV, and Dawson KA. Stoichiometry of

Dipalmitoylphosphatidylcholine-DNA Interaction in the Presence of  $\text{Ca}^{2+}$ : a Temperature-Scanning Ultrasonic Study. *FEBS Lett.* 1999; 446: 27-29.

17.- Lam MI, Cullis PR. Calcium Enhances the Transfection Potency of Plasmid DNA-Cationic Liposome Complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1463: 279-290.

18.- Fraústo da Silva JJR and Williams RJP. *The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life, Chapter 9: The Biological Chemistry of Magnesium:Phosphate Metabolism*, 2nd. ed., Oxford University Press, Oxford, New York, 2001, pp. 251-276.

19.- Chalikian TV, Völker G, Plum E and Breslauer KJ. A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: A characterization by calorimetric and volumetric techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 7853-7858.

20.- Uhrikova D, Rapp G, Kunst BH and Balgavy P. Interaction of DNA with DPPC Bilayers in the Presence of Mg (II) Ions, 1998; EMBL DESY Outstation – Hamburg; Project No: ML-98-6.

21.- Koynova R, Koumanov A, and Tenchov B. Metastable rippled gel phase in saturated phosphatidylcholines: calorimetric and densitometric characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996; 1285: 101-108.

22.- Sorokin VA, Valeev VA, Gladchenko GO, and Blagoi Yu P. Features of the interaction of bivalent metal ions with homopolynucleotides in the multichain conformation. *Biophysics*, 1994; 39,5: 821-832.

23.- Süleymanoğlu E. Turbidimetric Study of Interaction Between Polyribonucleotides, Phosphatidylcholine Vesicles and Metal Ions, NATO-Advanced Study Institute Proceedings: Trafficking of Intracellular Membranes: From Molecular Sorting to Membrane Fusion, June 19-30, 1994; Espinho, Portugal.

24.- Chong CS and Colbow K. Light scattering and turbidity measurements on lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976; 436: 260-282.

25.- Matsuzaki KO, Murase K, Sugishita S, Yoneyama K, Akada M, Ueha A, Nakamura and Kobayashi S. Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1467: 219-226.

26.- Gamon BL, Virden JW, and Berg JC. The aggregation kinetics of an electrostatically stabilized dipalmitoyl phosphatidylcholine system. *J. Coll. Interf. Science*, 1989; 132, 1: 125-138.

27.- Kuvitchkin VV and Sukhomudrenko AG. Interaction of natural and synthetic polynucleotides with liposomes in the presence of divalent cations. *Biophysics*, 1987; XXXII, 4: 628-633 (In Russian).

28.- Ivanov II. Chapter V: Calorimetric Methods of Studying Biopolymers and Membrane Systems, in: *Modern Methods of Biophysical Investigations – a Practicum of Biophysics*, Ed. A. B. Rubin, Vishaya Shkola, Moscow, 1988; pp 203 – 216, (In Russian).

29.- Braun CS, Kuelz LA and Midaugh CR. Ultraviolet absorption and circular dichroism spectroscopy of nonviral gene delivery complexes, In: *Methods in Molecular Medicine*, vol. 65: *Nonviral Vectors for Gene Therapy*, M. A. Findeis (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ., 2001; pp.253-284).

30.- Bloomfield VA, Crothers DM and Tinoco I Jr. *Nucleic Acids-Structures, Properties, and Functions*, University Science Books, Sausalito, California, 2000.

31.- Angelova MI and Tsoneva I. Interactions of DNA with giant liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, 1999; 101, 1: 123-137.

32.- Duguid JG and Bloomfield VA. Aggregation of melted DNA by divalent metal ion-mediated cross-linking. *Biophys J.* 1995; 69: 2642-2648.

33.- Avramovic-Zikic O, Colbow K. Turbidity changes of lipid vesicles near the phase transition temperature as an indication of fusion. *Biochim Biophys Acta.* 1978; Sep 11, 512(1):97-104.

- 34.- Bichenkov EE, Budker VG, Korobeinicheva IK, Savchenko EV, and Filimonov VV. DNA interaction with phosphatidylcholine liposomes. Melting of DNA and phase transition of the lipid membrane in the complex. *Biologicheski Membrani*. 1988; 5, 8: 843-851 (In Russian).
- 35.- Hud NV and Polak M. DNA – Cation Interactions: The Major and Minor Grooves are Flexible Ionophores. *Curr Opin Struct Biol*. 2001; 11: 293-301.
- 36.- Hauser H. Effect of inorganic cations on phase transitions. *Chem. Phys. Lipids* 1991; 57: 309-325.
- 37.- Jullien L, Cottet H, Hamelin B, and Jardy A. Thermodynamic behaviour of a supramolecular system self-assembled by electrostatic interaction in aqueous solution. Results and theoretical analysis. *J. Phys. Chem. B*, 1999; 103: 10866-10875.
- 38.- Castelli F and Raciti G. A calorimetric study of the influence of divalent cations on the thermotropic behaviour of some phosphatidylcholines. *Thermochim. Acta* 1991; 186: 205-215.
- 39.- Tatulian SA, Gordeliy VI, Sokolova AE and Strykh AG. A neutron diffraction study of the ions on phospholipid membrane interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991; 1070: 143-151.
- 40.- Grdadolnik J and Hadzi D. Conformational effects of metal salt binding to the polar head of phosphatidylcholines investigated by FTIR spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids*, 1993; 65: 121-132.
- 41.- Macdonald PM, Leisen J, and Marassi FM. Responce of phosphatidylcholine in the gel and liquid-crystalline states to membrane surface charges. *Biochemistry* 1991; 30: 3558-3566.
- 42.- Adrian-Scotto M, Vasileva D, Mallet G, and Vasilescu D. About hydration of Mg<sup>2+</sup>: a quantum DFT study. *Internet Electron. J. Mol. Des.* 2003; 1: 1-13.
- 43.- Saenger W. *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, MIR Publishers, Moscow, 1987; (The Russian Translation).
- 44.- Ahmad R, Arakawa H, and Tajmir-Riahi HA. A comparative study of DNA complexation with Mg(II) and Ca(II) in aqueous solution: Major and minor grooves bindings. *Biophys. J.* 2003; 84: 2460-2466.
- 45.- Tarahovsky YS, Khusainova RS, Gorelov AV, Nikolaeva TI, Deev AA, Dawson AK, and Ivanitsky GR. DNA initiates polymorphic structural transitions in lecithin. *FEBS Lett.* 1996; 390: 133-136.
- 46.- Akao T, Fukumoto T, Ihara H, and Ito A. Conformational change in DNA induced by cationic bilayer membranes. *FEBS Lett.* 1996; 391 (1-2): 215-8.
- 47.- Lobo BA, Rogers SA, Wiethoff CM, Choosakoonkriang S, Bogdanovich-Knipp S, and Middaugh CR. Characterization of Cationic Vector-Based Gene Delivery Vehicles Using Isothermal Titration and Differential Scanning Calorimetry, in: *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 65, Nonviral Vectors for Gene Therapy, Eds. M. A. Findeis, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 2001; pp 319-348.
- 48.- Safinya CR, Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2001; Aug. 11 (4): 440-8.
- 49.- Gelbart WM, Bruinsma RF, Pincus PA, and Parsegian VA. DNA-inspired electrostatics. *Physics Today*, 2000; Sep.: 38-44.
- 50.- Smith JG, Walzem RL, and German GB. Liposomes as agents of DNA transfer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993; 1154: 327-340.
- 52.- Mel'nikov SM, Dias R, Mel'nikova YS, Marques EF, Miguel MG, and Lindman B. DNA conformational dynamics in the presence of catanionic mixtures. *FEBS Lett.* 1999; 453: 113-118.
- 53.- Fujii G. To fuse or not to fuse: the effects of electrostatic interactions, hydrophobic forces, and structural amphiphilicity on protein-mediated membrane destabilization. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 20; 38(3):257-277.

- 54.- Kirby CJ and Gregoriadis G. Liposomes, in: E. Mathiowitz (Ed.), Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., 1999; pp. 461-492.
- 55.- Opanasopit P, Nishikawa M, Hashida M. Factors affecting drug and gene delivery: effects of interaction with blood components. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2002;19(3):191-233.
- 56.- Kamiya H, Akita H, Harashima H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in gene therapy. Drug Discov Today. 2003; 1; 8(21):990-6.
- 57.- Lin AJ, Slack NL, Ahmad A, George CX, and Samuel CE. Three-dimensional imaging of lipid gene-carriers: membrane charge density controls universal transfection behaviour in lamellar cationic liposome-DNA complexes. Biophys. J. 2003; 84: 3307-3316.
- 58.- Mönkkönen J and Urtti A. Lipid fusion in oligonucleotide and gene delivery with cationic lipids. Adv. Drug Deliv. Rev., 1998; 34: 37-49.
- 59.- Sato Y, Nomura S-I, and Yoshikawa K. Enhanced uptake of giant DNA in cell-sized liposomes, Chem, Phys. Lett., 2003; 380: 279-285.
- 60.- Esponda P, Goldstein M, and Witkin SS. In vitro transfection of the human vas deferens using DNA-liposome and DNA-neutral lipid complexes. Fertility and Sterility 2004; 81;1: 171-175.

---

Comment reviewer Prof. Ernesto Moro, MD. PhD. Prof. of Histopathology. Health of Sciences Faculty, University Rey Juan Carlos. Madrid. Spain.

In this work E. Süleymanoglu deals with new ways to create suitable non-viral gene therapeutic vehicles. So, he supports the idea that DNA-lipid (lipoplexes) mixtures could improve bioavailability and decrease immunotoxicity. The author focuses on the kinetics and thermodynamic parameters of phospholipid-nucleic acid complex formations in presence of Mg<sup>2+</sup> emphasizing the use of zwitterionic species as an alternative to the cytotoxic cationic lipids, as also was suggested by Kharakoz D.P et al (1999). He gives us in his methods a precise and complete explanation of how he makes the liposome-nucleic acid mixtures with their UV/VIS spectrophotometry, turbidimetric and differential scanning calorimetry analyses.

As a pathologist, I miss a morphological study in order to know the size and other measurements of that lipoplexes. Being agree it is not completely needed, that could help to understand if the vesicles proposed could interact with such a complex and most of the times impenetrable plasmalemma.

---

Comment Reviewer Prof. Pilar Muñiz Rodríguez PhD. Biochemistry and Molecular Biology. University of Burgos. Spain.

One of the fields of study in which refers to genes transfer techniques, are those studies carried out with non-viral vector as the liposomes, with the purpose to avoid the problems derived from the utilization of virus in the transfer of genes. Currently, many works in this field are centred in the study of the stability of the complexes formed by nucleic acids and liposomes, by their possible influence in the capacity of gene transfer.

In this article, the author used the DSC (Differential Scanning Calorimetry) technique presents a study of the thermodynamic stability of ternary complex DNA-DPPC- Mg<sup>2+</sup>. Results presented show that the triple complex it remains stable at different incubation times and the DNA contribute to the stabilization of this ternary complex. These new data present a new information about of genic transport based on direct fusion with the cell membrane.

**Comment Reviewer Jose Nazario PhD, . (Biochemistry). Researcher, Arbor Networks. Ann Arbor. USA.**

**In this article, Suleymanglu introduces new measurements into the field of DNA-liposome stability via cations. Using DSC measurements and an analysis firmly grounded in previous literature, the groundwork for additional insights into vesicle-mediated DNA delivery in vivo has been laid. The experiments are clear and direct, the results are presented with a reasonable interpretation, and the conclusions are sound.**

**Overall i'm much more pleased with this version of the paper. The authors present more complete experimental results than they did in the first draft, and they present them in a manner that supports many of their conclusions more strongly.**

---

**Received: November 4, 2003.  
Received corrected : March 2, 2004  
Published: June 13, 2004**





ISSN: 1697-090X

[Inicio Home](#)

[Indice del  
volumen Volume  
index](#)

[Comité Editorial  
Editorial Board](#)

[Comité Científico  
Scientific  
Committee](#)

[Normas para los  
autores  
Instruction to  
Authors](#)

[Derechos de autor  
Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)



## MEDICINA, CIENCIA Y MEDICINA BASADA EN LA EVIDENCIA.

Ramon Díaz-Alersi, MD.

Hospital Puerto Real. Cádiz. España

[rda @ uninet.edu](mailto:rda@uninet.edu)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2004;2:36-45

---

[Comentario del Dr. Javier Peromarta Bello PhD.](#) Máster en Bioética. Valladolid. España.

[Comentario del Prof. Sandro E. Bustamante, M.Sc.](#) ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago. Chile.

[Comentario del Dr. Javier Lozano García.](#) Jefe de Medicina Preventiva y Salud Pública. Coordinador de Calidad del Hospital General Yagüe. Burgos. España.

---

*"An open mind is a virtue. But not so open that your brains fall out."* (Carl Sagan).

La Medicina basada en la evidencia (MBE) que nació como un método de enseñanza de la medicina, ha llegado a ser un movimiento de gran importancia. Sin embargo, aunque todos hablamos de ella, muchos de los médicos no tienen una noción exacta de cuál es su definición ni su valor en la práctica actual de nuestra profesión. No obstante, existe un debate permanente sobre su utilidad y su papel entre las diferentes formas de practicar la medicina. Este debate está muchas veces alimentado precisamente por el escaso conocimiento del alcance exacto de la MBE y por la poca formación de los médicos en la historia de la ciencia.

La definición oficial de la MBE es "el proceso de búsqueda sistemática, valoración y utilización de los hallazgos de la investigación médica como base para las decisiones clínicas. La MBE responde a preguntas, encuentra y valora datos y configura la información para la práctica clínica diaria. La MBE sigue cuatro pasos: formulación de una pregunta clínica clara a partir de un problema clínico, búsqueda en la literatura de artículos relevantes, evaluación (valoración crítica) de su validez y utilidad y puesta en práctica de los hallazgos en la práctica clínica". El término MBE fue acuñado en la McMaster Medical School de Canadá en los años ochenta para nombrar a esta estrategia de aprendizaje clínico. Esta definición es una traducción de la que recoge el Medline en su diccionario de términos MeSH y procede a su vez de un artículo publicado en 1995 en el BMJ<sup>1</sup>.

Sin embargo, los críticos de la MBE arguyen, siguiendo sus propios términos, que no existen pruebas de que la práctica de la MBE de lugar a una mejoría en el tratamiento médico. Otros la acusan de absurda o irracional, otros de despreciar o minusvalorar a las ciencias básicas a las que suponen el origen de todos los conocimientos médicos.

El fondo del debate es, naturalmente, cual es la mejor forma de practicar la medicina, y su enrevesamiento se debe al poco acuerdo existente, tanto en la definición de la MBE como en la enumeración de cuales son sus alternativas válidas y qué relación hay entre ellas. Además, el debate está considerablemente agriado por las posturas irreconciliables de unos y otros. Así, los defensores de la MBE, en un intento de proteger a este movimiento bajo el paraguas de la "ciencia buena" la han definido como "un cambio de paradigma" en el sentido que esta expresión tiene para el historiador de la ciencia T. Kuhn. Esto, además de ser difícilmente comprobable, ha ocasionado una reacción de los opositores que califican a la definición oficial como de inútil y tautológica, ya que lo que viene a decir en resumidas cuentas es que la MBE es la mejor forma de ejercer la medicina, que es lo que se supone que intentamos hacer todos (es decir, a la pregunta de "¿cuál es la mejor forma de practicar la medicina?" se responde con que es "la mejor forma de practicar la medicina")<sup>2</sup>.

Pero ya que entramos en definiciones que atañen a la epistemología, no estaría de más que intentáramos explorar un poco la vinculación de la Medicina en general y de la MBE en particular con la Ciencia. Para ello podemos usar los puntos de vista, o mejor las teorías de historiadores de la ciencia del siglo XX, en particular del propio Kuhn y de alguien que levanta aún más polémicas (principalmente desde el punto de vista político, en mi opinión) como es Popper. Pero en primer lugar tenemos que buscarnos una definición de trabajo de la MBE que sea lo suficientemente precisa y neutra como para ser aceptada por la mayoría. Creo que "la manera de practicar la medicina que considera a los ensayos clínicos aleatorizados como la fuente de máximo valor para determinar la seguridad y la eficacia de los actos médicos" puede cumplir con esos propósitos. Vista así, otras maneras de practicar la medicina que pueden oponerse a la MBE serían la basada en las ciencias básicas, la basada en la experiencia clínica y la basada en la observación.

#### MBE Y KUHN.

Según Thomas Kuhn, la ciencia evoluciona con periodos prolongados de "ciencia normal" que alternan con otros más breves de "revoluciones científicas" o de cambio de paradigma. Este autor cuestiona el concepto tradicional de progreso científico como una adquisición de conocimientos gradual basado en la elección racional de un marco experimental. Para él es el paradigma el que determina el tipo de experimentos, los tipos de cuestiones y los problemas que son considerados importantes por los científicos. Un paradigma es el conjunto completo de creencias, valores y técnicas que son compartidos por una determinada comunidad. El paradigma representa al contexto compartido y, dentro de él, los científicos trabajan en la resolución de problemas que sólo son comprensibles dentro de él. Durante los periodos de ciencia normal no hay casi progreso científico. Cada cierto tiempo el paradigma entra en crisis y se produce una revolución científica que lo arrinconan y lo sustituye por uno nuevo; dentro de él, la comunidad científica tiene un nuevo conjunto de valores y de problemas por resolver. Los periodos de investigación científica normal se caracterizan también por sus marcadas tendencias conservadoras, los investigadores son premiados no tanto por su originalidad como por su aportación al trabajo de confirmación de la teoría dominante. La tenacidad científica es también una de las características que define los periodos de ciencia normal. Esta tenacidad se manifiesta principalmente en la resistencia a cualquier manifestación externa y contraria al paradigma dominante. Para Kuhn, ésta es una característica que se origina con el entrenamiento científico que prepara a los estudiantes para desenvolverse dentro de un solo paradigma científico. El progreso científico se produciría sobre todo en épocas de crisis. Las revoluciones ocurren porque un nuevo logro o paradigma presenta nuevas formas de ver las cosas, creando con ello nuevos métodos de análisis y nuevos problemas que resolver. En la mayoría de los casos, las teorías y problemas anteriores son olvidados o guardados como reliquias históricas (pérdidas kuhnianas). Revoluciones científicas serían las ocasionadas por las teorías de Newton y de Einstein.<sup>3</sup>

En este contexto es en el que se afirma que la MBE es un cambio de paradigma. La MBE, la nueva forma de ejercer la medicina sería claramente superior a cualquiera de las formas anteriores (aunque en la tesis de Kuhn solo sería distinta, no necesariamente mejor). Esto provoca el rechazo lógicamente, ya que el cambio de paradigma vuelve inútil y anticuado a todo lo anterior y obliga a elegir entre lo nuevo y lo supuestamente viejo y desfasado. Sin embargo, no se aprecian cambios sustanciales en el modo de practicar la medicina antes y después de la aparición de la MBE, en todo

caso se evoluciona hacia una sistematización de los conocimientos y de su forma de adquirirlos. Así, pasamos de la medicina basada en la experiencia clínica a los estudios observacionales (que pueden ser considerados como experiencia sistematizada) y de estos a los ensayos clínicos en los cuales se intenta controlar el medio de forma que interfiera lo menos posible en las observaciones. El problema no es tanto que Kuhn no definiera el grado de cambio que debe haber para considerar un cambio de paradigma, como la propiedad de "inconmensurabilidad" que para él tienen los cambios paradigmáticos. Es decir que la nueva teoría surgida de la revolución o que la causó no es medible o comprensible con el sistema de valores antiguos ni al revés. Esto resulta claro cuando se intenta explicar la relatividad general con la teoría de Newton, por ejemplo. Pero esto no ocurre con la medicina. Dentro de nuestro sistema de valores son perfectamente comprensibles las teorías médicas de años atrás y, suponemos, nuestros predecesores no tendrían dificultad en valorar las bondades de un ensayo clínico.

Por otro lado, la irracionalidad que este modelo impone al cambio científico constriéndolo casi totalmente a su historia externa o a la sociología del conocimiento, y negando la posibilidad de progreso de la ciencia, hace que de igual forma se pueda defender cualquier otro modelo de medicina, como por ejemplo las llamadas "medicinas alternativas". De hecho, es así como muchos naturópatas resisten al método crítico, aduciendo la inconmensurabilidad de su modelo y el de la medicina "oficial" u exigiendo que los remedios naturópatas se prueben desde sus supuestos teóricos. De cualquier manera, sería interesante que antes de apoyarse en las tesis de Kuhn, sus defensores repasaran cuales son realmente esas tesis, ya que, como dijo Bunge, "*Kuhn no es uno sino trino*"<sup>4</sup>

## MBE Y POPPER

Popper es un filósofo que levanta tanta polémica en su campo como la propia MBE. Gran parte de esta polémica se debe igualmente a razones ideológicas más que lógicas y se debe al rechazo que ocasiona en algunos su franca posición antimarxista.

En medicina, el nombre de Popper se asocia frecuentemente con el contraste de hipótesis estadísticas y con la aplicación de lo que él llama método científico a la práctica médica. Antes de entrar en detalles tendremos que revisar los conceptos de hipótesis y de inducción.

En el lenguaje normal, una hipótesis es una predicción mediante la que se describe en forma concreta lo que se espera que sucederá si se cumplen ciertas condiciones. Por ejemplo, la exposición al coronavirus provoca el llamado SIRS.

En Ciencia, para explicar determinados hechos en el contexto del trabajo científico se plantean conjuntos organizados de proposiciones entre los que no se da una contradicción manifiesta. A estos conjuntos de proposiciones se la llama "hipótesis de trabajo".

En Filosofía Analítica una hipótesis es un juicio o enunciado, o conjunto organizado de juicios o enunciados, de los cuales no se conoce con certeza si son verdaderos, que son necesarios para llegar a otros (constituyendo la base de estos enunciados), para explicar un estado de cosas, un fenómeno o una observación. Más sencillamente, siguiendo la definición de Platón, una hipótesis es un supuesto del que se extraen consecuencias. Un ejemplo sería la hipótesis del átomo para explicar la constitución de la materia. Esas hipótesis se ponen a prueba mediante nuevas observaciones o experimentos que pueden corroborarlas o negarlas. Cuando la hipótesis aumenta así su grado de confirmación se convierte en teoría (la teoría atómica en este caso).

En estadística, cuando se habla de hipótesis de trabajo, realmente se habla de dos hipótesis: una que describe la suposición formulada directamente y la otra, implícita o tácita que describe la contraria. Por ejemplo, al formular la hipótesis de que una adecuación de la oferta de plazas de MIR influiría positivamente en las oportunidades de trabajo de los especialistas, estamos prediciendo una relación entre la variable "adecuación" y la variable "oportunidades de trabajo". Para formular esta hipótesis deberemos construir dos enunciados, uno en que se describe esa predicción, como se ha hecho antes, y otro en que se describe la posible disparidad entre esa "adecuación" y las "oportunidades de trabajo". Si se hace la predicción de que se dará una relación entre las variables A y B sin especificar si se trata de relación positiva o negativa, el único otro resultado posible es el de la no-relación entre A y B. La predicción que favorecemos es denominada hipótesis alternativa, y la contraria de la observación hipotética, es llamada hipótesis cero. La lógica de la hipótesis se basa en

dos principios básicos: 1) La formulación de dos hipótesis que se excluyen mutuamente y que abarcan juntas todo el campo de posibles resultados y 2) al comprobar la hipótesis, necesariamente, la aceptación de una implica rechazar la otra.

El avance de las ciencias empíricas mantuvo la idea clásica (de Platón) de la hipótesis, pero alteró la exigencia de su fundamentación: en lugar del recurso a la razón se recurrió a la experiencia. El positivismo exigía así la verificación empírica de toda proposición no tautológica (es decir, de proposiciones con carácter sintético, no analítico). De ahí se pasó a formular el principio empiricista de "sentido": lo que no es verificable no sólo no es algo carente de base científica, sino además es algo "sin-sentido". Más tarde se demostró la imposibilidad de mantener esta idea al intentar determinar las "leyes" naturales, las cuales no son verificables. Así Hume ya había indicado la falta de conclusión lógica al querer deducir desde afirmaciones verdaderas sobre el pasado otras proposiciones sobre el futuro también verdaderas. La base de este razonamiento está ya expuesta en la parte primera del libro primero de su "Tratado de la Naturaleza":

*"Debemos considerar ahora qué sucede con nuestras percepciones simples. Después del examen más exacto de que soy capaz me aventuro a afirmar que la regla es válida aquí sin excepción alguna y que toda idea simple posee una impresión simple que se le asemeja, y toda impresión simple, una idea correspondiente. La idea de rojo que formamos en la obscuridad y la impresión de éste que hiere nuestros ojos a la luz del Sol difieren tan sólo en grado, no en naturaleza. Es imposible probar por una enumeración particular que sucede lo mismo con todas nuestras impresiones simples e ideas. Cada uno puede convencerse, con respecto a este punto, recorriendo tantas como le plazca; pero si alguno negase esta semejanza universal, no veo otro modo de convencerle más que pidiéndole que muestre una simple impresión que no tenga una idea correspondiente, o una idea simple que no tenga una impresión correspondiente. Si no respondiese a este desafío, como ciertamente no lo hará, podremos, dado su silencio y nuestra propia observación, establecer nuestra conclusión."* <sup>4</sup>

Esto lo explica Popper con el ejemplo de los cisnes: no nos autoriza a afirmar que todos los cisnes son blancos <sup>5</sup>

Por esta razón, Popper le da la vuelta al problema y formula su "criterio de falsabilidad" (refutabilidad): la exigencia de que toda proposición científica debe formularse de tal forma que pueda mostrarse por medios empíricos si es falsa. En su ejemplo, sólo estaríamos autorizados a decir que todos los cisnes son blancos de forma provisional y tal afirmación nos debería encaminar a hacer observaciones que demostraran la falsedad de tal hipótesis <sup>5</sup>. La explicación es sencilla, puesto que nunca podremos saber si algún día observaremos un cisne "no blanco", nunca sabremos si la hipótesis es verdadera, en cambio la observación de un solo cisne "no blanco" demostraría que es falsa. Popper introdujo la "falsabilidad", no como criterio para determinar el "sentido" o significado, sino como un criterio para distinguir entre lo que se debe considerar como enunciados científicos y los que no lo son. La tesis de que todo enunciado sobre leyes naturales es refutable o falsable supuso un paso adelante para delimitar los rasgos esenciales del conocimiento científico.

La falsabilidad como criterio de demarcación entre lo que es y lo que no es conocimiento científico es lo que ha hecho a Popper tan atractivo entre aquellos que intentan llevar la práctica médica al terreno exclusivamente científico.

Aunque Popper no se ocupó mucho del problema de la hipótesis estadística, las convenciones para el contraste de hipótesis casan bien con sus requerimientos de falsabilidad de una hipótesis *a priori*. Una hipótesis debe ser claramente formulada antes de ser contrastada y el objetivo es rechazar la hipótesis nula de no diferencia.

La hipótesis nula nunca puede ser demostrada, sólo se la puede refutar mediante la experimentación. Sin embargo hay estudios lo que se busca es precisamente demostrar una igualdad. Por ejemplo cuando se pretende demostrar que un acto médico es menos agresivo que el tradicional es igual de eficaz. O cuando se pretende demostrar que un tratamiento que es más eficaz tiene una tasa semejante de efectos indeseables. En estos casos nos encontramos en una situación paradójica que en la práctica se resuelve afirmando que el tratamiento A no es inferior al B, es decir, afirmamos que no hemos podido rechazar la hipótesis nula <sup>6</sup>. Esto no es epistemológicamente correcto, ya que no es correcto diseñar un experimento cuyo objetivo no sea demostrar la falsedad de la hipótesis y en ello se basan los que afirman que las similitudes entre el pensamiento de Popper y el contraste de

hipótesis son solo formales y que en realidad los razonamientos son opuestos e incompatibles <sup>4, 7</sup>.

Sin embargo, el progreso del conocimiento médico mediante el uso de los ensayos clínicos aleatorizados es totalmente coherente con el pensamiento de Popper. En un rápido resumen, para este autor el conocimiento (cualquier tipo de conocimiento) avanza por tanteo, por el método de la prueba y el error. Al plantearse un problema se tantean hipótesis explicativas, cuanto más creativas y audaces, mejor. A esas hipótesis las llama conjeturas. De esas conjeturas deben deducirse consecuencias y estas consecuencias deben de poder ponerse a prueba. Cuando una conjetura no es contradicha por las pruebas resulta fortalecida. Cuando no lo es por muchas pruebas distintas, se fortalece aún más y finalmente puede alcanzar el rango de teoría. Sin embargo, basta que un solo experimento, prueba u observación la contradiga para que la conjetura deba considerarse falsa. Ya que no es posible saber si se hará alguna vez una observación o se realizará un experimento que las contradiga, las hipótesis y las teorías solo se aceptan de forma provisional, nunca definitivamente. Para que esas conjeturas puedan ser consideradas como hipótesis científicas deben incluir en su planteamiento alguna mecanismo que pueda usarse para demostrar que es falsa, es decir, debe ser falsable <sup>8-11</sup>.

Aplicando estos conceptos a los diversos modos de practicar la medicina, podemos observar que los ensayos clínicos aleatorizados se realizan para responder a un problema, parten de una hipótesis y contienen todos los elementos necesarios para falsar (aunque se hable de verificar) esa hipótesis. La búsqueda del conociendo con este método puede ser considerada como científica y, por tanto, es la mejor forma de la que dispone nuestra mente para acercarse a la verdad física. Pero hay otras formas de adquirir conocimiento en medicina, por ejemplo a través de las ciencias básicas y no se discute que estas sigan el método científico. No son mejores ni peores formas de adquirir conocimientos que la MBE, son complementarios.

Tan complementarios que normalmente las hipótesis que son puestas a prueba en los ensayos clínicos son deducidas de postulados de las ciencias básicas. Y más aún, ya que una hipótesis no resulta inmediatamente refutada por un solo experimento en contra (siempre se puede argüir en contra de la validez del experimento o de las observaciones y, dado que la medicina no es una ciencia exacta hay que ser precavidos y repetir el experimento o hacer otros nuevos antes de rechazar definitivamente la hipótesis), este experimento tendrá mucho más valor si corrobora una hipótesis basada en conocimientos proporcionados por la ciencia. Lo contrario también es cierto, siempre estaremos más dispuestos a aceptar provisionalmente una hipótesis que ha sido apoyada por un experimento si fue formulada según teorías de las ciencias básicas que si no lo fue o fue formulada en contra de estos conocimientos. Dos ejemplos pueden servir para aclarar esto.

La teoría de la arteria abierta nos dice que la reapertura precoz del vaso obstruido mejora el pronóstico en la miocardiopatía isquémica y esto es así porque son conocidas las alteraciones tisulares ocasionadas por la isquemia y que los tejidos son capaces de resistir cierto tiempo, poco, a costa de sus reservas de energía. Esta teoría ha originado varias hipótesis para acortar los tiempos entre el comienzo de la isquemia y el tratamiento repermeabilizador, las cuales han sido confirmadas en general por numerosos ensayos clínicos. Sin embargo, esta teoría, formulada siguiendo los conocimientos proporcionados por ciencias básicas, está sufriendo dificultades crecientes causadas por observaciones provenientes de otros tipos de experimentos y quizás termine por ser refutada. <sup>12</sup> Esto, sin embargo, no influye en nuestra aceptación de los tratamientos basados en los ensayos antes mencionados, puesto que han demostrado su acción beneficiosa. Otra cosa es que ahora deba justificarse esa acción mediante otros mecanismos los cuales habrán de ser formulados como nuevas hipótesis, que a su vez habrán de ser contrastadas mediante ensayos clínicos. Esto a su vez, origina un progreso en el conocimiento científico.

El caso opuesto puede estar representado por la introducción de la proteína C activada en el tratamiento del shock séptico. El ensayo PROWESS <sup>13</sup> parece demostrar su efectividad, pero su aceptación no ha sido ni mucho menos generalizada. Esto se debe, tanto a fallos metodológicos como a que no existe ninguna hipótesis explicativa de la acción de la proteína C activada en el shock séptico. La ausencia de una explicación científica nos hace más reacios a aceptar el papel beneficioso de este fármaco. Es cierto que se conocen sus acciones antiinflamatorias tanto como las que tiene sobre la coagulación, sin embargo, otros tratamientos encaminados a corregir las alteraciones de la coagulación del shock séptico, como la antitrombina III, no han resultado efectivos, así que probablemente, su supuesto efecto se debería a una acción antiinflamatoria. Pero existen otros muchos antiinflamatorios probados antes sin éxito y a fin de cuentas ¿qué ocasionó la elección de la proteína C activada en particular?



Si examinamos los estudios observacionales podemos llegar a una conclusión semejante con respecto a su valor. Se busca el conocimiento con el mismo esquema, pero con menor control de la multitud de variables que pueden interferir en las observaciones. Al haber menos control, hay más errores, hay más probabilidad de que una hipótesis falsa sea aceptada como verdadera, pero siguiendo la tesis de Popper, al ser aceptada solo provisionalmente, se trata de un daño menor. Podemos admitir por tanto que la práctica basada en los estudios observacionales tiene menos fiabilidad que la que se basa en los ensayos clínicos, pero la diferencia es solo de grado, no hay una diferencia radical. De hecho, es inevitable basarse en los estudios observacionales cuando no hay mejor evidencia disponible.

Igualmente no se puede afirmar que haya una diferencia radical entre la MBE y la basada en la experiencia clínica, una vez más hay solo una diferencia de grado causada por una menor calidad de las observaciones. El esquema para la obtención del conocimiento sigue siendo el mismo de problemas - conjeturas - deducciones - observaciones (o experiencia en este caso) - aceptación provisional o rechazo de las conjeturas.

La conclusión es pues que no hay un cambio radical en la práctica médica introducido por la MBE. Se trata solo de una sistematización en la adquisición del conocimiento y en su aplicación práctica, cada vez más necesaria ante el aumento exponencial de la información supuestamente veraz en los últimos veinte años. Esta sistematización se inclina decididamente por la ciencia, rechazando otras formas de conocimiento y adopta el método científico para la elaboración de las hipótesis y la crítica de la evidencia. El rechazo que produce se debe muchas veces al desconocimiento de su significado, al temor a quedar desfasado y a las ideas mantenidas o a las conductas percibidas en muchos de sus partidarios. El entusiasmo con que la MBE es defendida en ocasiones (a veces sin un conocimiento profundo de su significado), la confusión de ciencia con cientifismo, tan propia de nuestros tiempos, la identificación de la MBE con la doctrina sanitaria del partido en el poder, y la polémica que suscitan algunos filósofos de la ciencia en cuyas tesis puede encontrar la MBE una justificación tienen, en mi opinión, mucho que ver con ese rechazo. Para todos los que tienen estos temores no viene mal recordar la diferencia (según Popper) entre ciencia y cientifismo: "el cientifismo afirma dogmáticamente la autoridad del conocimiento científico; mientras que yo no creo en autoridad alguna y siempre me he resistido al dogmatismo; y sigo resistiéndome, especialmente en ciencia".

#### **MBE y medicinas alternativas**

Pero hasta ahora hemos comparado la MBE con otros métodos de práctica médica que nos parecen igualmente válidos porque comparten con ella el mismo marco teórico. Hay otras formas de "curar" que reciben el nombre de medicina aunque no son aceptadas como tales científicamente. Aquí hay nuevamente un problema de definiciones, para la Real Academia Española, medicina es la "Ciencia y arte de precaver y curar las enfermedades del cuerpo humano" <sup>14</sup>. Una definición en todo semejante da el Merriam-Webster's Dictionary: "the science and art dealing with the maintenance of health and the prevention, alleviation, or cure of disease"<sup>15</sup>. Como puede verse hay dos aspectos en la medicina: la medicina como arte y la medicina como ciencia. Esto es así desde hace siglos, aunque el énfasis sobre una de las partes del binomio ha ido desplazándose desde el arte a la ciencia. Además podríamos discutir si realmente ha sido alguna vez un arte, pero esto nos haría salirnos del tema. Es suficiente con decir que arte se refiere probablemente a la experiencia y las habilidades adquiridas por el médico a lo largo de su vida (es decir, a las técnicas) y ciencia a la adquisición del conocimiento contrastable. En nuestro tiempo, la importancia del arte, transformado en técnica se sigue manteniendo, sobre todo en la formación de postgrado, en la especialización y en las normativas de las cada vez más frecuentes normas de acreditación para realizar determinadas técnicas

Pero la base de la medicina actual es la ciencia. La medicina que se practica hoy es una medicina científica, es decir, que sigue el método científico en la búsqueda de conocimientos nuevos. Esto no cambia la definición, pero nos da una norma de distinción entre lo que es medicina y lo que no lo es (o en lenguaje común, una distinción entre la medicina "oficial" de las llamadas medicinas "alternativas"). El problema de la demarcación (entre ciencia y no-ciencia), uno de los problemas fundamentales de la filosofía de la ciencia, vuelve a ser el centro del debate.

Durante gran parte del siglo XX hubo un acuerdo en que la ciencia es la mejor (y quizás la única manera) de aumentar nuestros conocimientos sobre el mundo real o físico. Esto es así desde los positivistas (todo enunciado tiene que ser verificable, si no es un "sin-sentido") y los falsacionistas



(toda conjetura tiene que ser refutable, en caso contrario no es una conjetura científica, sino pseudocientífica o metafísica), pero siempre hubo una fuerte oposición de otras tesis como la de Kuhn sobre la influencia del contexto en la ciencia y la ausencia de progreso científico, o la de Feyerabend<sup>16</sup> que directamente negaba que la ciencia fuera algo más que una de las formas de conocer la realidad (todo vale). El problema es que se confunde el "todo vale" para hacer conjeturas de Popper con el "todo vale" de los relativistas, para los cuales tiene igual valor cualquier visión del mundo, esté científicamente probada o no.

Los partidarios de las medicinas alternativas se escudan detrás de teorías relativistas haciendo sus prácticas inmunes al contraste científico y proclaman que todo es lícito para curar. Esto es especialmente claro en los casos de la acupuntura y la homeopatía, quizás las dos medicinas alternativas con más prestigio social. La acupuntura basa su práctica en antiquísimos conocimientos procedentes de China cuya base teórica se ha perdido en gran parte. Al predicar su efectividad se acogen al modelo de paradigmas de Kuhn y establecen la imposibilidad de la comparación con la medicina científica. Otro tanto, ocurre con la homeopatía, que partiendo de un modelo teórico de la enfermedad y probablemente de todo el mundo real, propone remedios terapéuticos que son solo agua. También estos aducen la imposibilidad de toda comparación con la medicina científica y que los experimentos para contrastar sus métodos deben realizarse dentro de su marco teórico.

Hay que decir que estas medicinas tienen su mayor expansión en el tratamiento de procesos crónicos de difícil cura y de difícil evaluación como es, por ejemplo, el dolor crónico de todo tipo. El fracaso de la medicina científica en obtener una mejoría clara de estos procesos hace que los pacientes acudan a otros tipos de terapia. La medicina científica no duda en valorar, si es preciso, estos remedios alternativos, pero siguiendo las normas del método científico, lo cual es rechazado (esto puede comprobarse en el Pubmed que tiene incluso un apartado dedicado a la homeopatía). Lo que pasa es que, al estarse contrastando hipótesis que van contra las teorías dominantes (las que han resistido la refutación no una, sino muchas veces), los resultados de los escasos experimentos que parecen "confirmar" las tesis alternativas no son fácilmente creíbles y siempre se podrá aducir un fallo de forma.

#### BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Rosenberg W, Donald A. Evidence based medicine: an approach to clinical problem-solving. BMJ. 1995 Apr 29;310(6987):1122-6. Disponible en: <http://bmj.bmjournals.com/cgi/content/full/310/6987/1122>
- 2.-Sehon SR, Stanley DE. A philosophical analysis of the evidence-based medicine debate. BMC Health Services Research 2003 3:14. Disponible en <http://www.biomedcentral.com/1472-6963/3/14>
- 3.-Kuhn TS. La estructura de las revoluciones científicas (1962). México, DF: Fondo de Cultura Económica, 1975. Disponible en <http://www.cibernous.com/autores/kuhn/teoria/>
- 4.-Banegas, JR; Rodríguez Artalejo, F; del Rey Calero, J.: Popper y el problema de la inducción en epidemiología. Rev Esp Salud Pública 2000; 74:327-339. Disponible [http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1135-57272000000400003&Ing=es&nrm=iso](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272000000400003&Ing=es&nrm=iso).
- 5.- Kuhn, tres pensadores en uno. Mario Bunge disponible en [http://www.infanciayjuventud.com/anterior/academic/academ\\_7b\\_2002.html](http://www.infanciayjuventud.com/anterior/academic/academ_7b_2002.html)
- 6.- Molinero L.M: Hipótesis y decisiones. Sociedad Española de Hipertensión - Liga Española para la lucha contra la hipertensión arterial. Disponible en <http://www.seh-lelha.org/errorbeta.htm#TOP>
- 7.-García FM: Popper, el contraste de hipótesis y el método crítico. Rev Cubana Salud Pública 2003; 29(1):52-60. Disponible en [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-34662003000100008&Ing=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662003000100008&Ing=es&nrm=iso).

- 8.- David Hume. Tratado de la naturaleza humana : ensayo para introducir el método del razonamiento experimental en los asuntos morales. Biblioteca Virtual Miguel de Cervantes. Disponible en <http://www.cervantesvirtual.com/servlet/SirveObras/34671820100948506311191/index.htm>
- 9.-Popper, KR. La ciencia: conjeturas y refutaciones (1965), Bs. As., Paidós, 1967
- 10.-Popper KR. La sociedad abierta y sus enemigos (edición revisada) (1966). Addenda. Barcelona: Paidós; 1994.
- 11.-Popper KR. En busca de un mundo mejor (1994), Paidós, Barcelona, 1996
- 12.- Braunwald E. The open-artery theory is alive and well--again. N Engl J Med. 1993 Nov 25;329(22):1650-2. Disponible en: <http://content.nejm.org/cgi/content/full/329/22/1650>
- 13.- Scott T. Micek, Pharm.D.; Rina A. Shah, Pharm.D.; Marin H. Kollef, M.D.: Management of Severe Sepsis: Integration of Multiple Pharmacologic Interventions. Pharmacotherapy 23(11):1486-1496, 2003. Disponible en [http://www.medscape.com/viewarticle/464631\\_print](http://www.medscape.com/viewarticle/464631_print)
- 14.- Diccionario de la Lengua Española, vigesimosegunda edición. Disponible en <http://buscon.rae.es/diccionario/drae.htm>
- 15.-Merriam-Webster Online. Disponible en <http://www.merriam-webster.com/>
- 16.-Feyerabend, P.: Tratado contra el método. 3ª ed., Madrid, Tecnos, 1997. Disponible en [http://www.inicia.es/de/diego\\_reina/filosofia/fil\\_ciencia/feyerabend\\_metodo.htm](http://www.inicia.es/de/diego_reina/filosofia/fil_ciencia/feyerabend_metodo.htm)

---

**Comentario del Dr. Javier Peromarta Bello PhD. Master en Bioética. Valladolid. España.**

En el artículo se define la MBE como la práctica de la Medicina que considera los ensayos clínicos estadísticamente diseñados como la fuente de máximo valor para determinar la seguridad y eficacia de los actos médicos.

La denominación MBE surgió en Canadá en los años ochenta, para referirse a este método de aprendizaje clínico. El Autor defiende la complementariedad entre la práctica de la Medicina según el método MBE y la Medicina basada en la experiencia clínica.

Los defensores de la MBE se acogen al concepto de cambio de paradigma (T. Kuhn, profesor de Historia de la Ciencia) y recurren con gusto al principio de falsabilidad de K. Popper (profesor de Filosofía de la Ciencia).

Según Popper, todo enunciado de sobre leyes naturales es refutable o falsable; este principio permite distinguir claramente entre cientifismo y verdadera ciencia. El cientifismo (una de cuyas características es reducir la realidad a lo experimentable) afirma dogmáticamente la autoridad del conocimiento científico, mientras que la verdadera ciencia permanece siempre abierta a ulteriores revisiones.

---

**Comentario del Prof. Sandro E. Bustamante, M.Sc. ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago. Chile.**

**Me parece un muy buen ensayo respecto a un t3pico candente en el campo de la ense1anza de la medicina. La lectura del mismo, me sugiere estas consideraciones:**

**En la definici3n de trabajo de Medicina Basada en la Evidencia (MBE), el autor establece que una correcta definici3n de la MBE es la de los ensayos cl3nicos aleatorizados. Sin embargo, 2no deber3a considerar adem3s el doble ciego?. La mayor3a de los ensayos cl3nicos que se citan en la literatura cient3fica internacional, publicadas en revistas ISI, incluyen en su dise1o el doble ciego con el prop3sito de valorar y cuantificar la influencia subjetiva (positiva o negativa), tanto del operador del acto m3dico como del operando o receptor del acto m3dico. Es relevante poder controlar satisfactoriamente esta variable desconcertante en la contrastaci3n de los resultados de la puesta a prueba de la hip3tesis de trabajo. No debemos desconocer el efecto placebo, en ocasiones buscado en el acto m3dico, pero que en el contexto del presente ensayo, es una variable que puede distorsionar la interpretaci3n de los resultados modificando el hilo conductor de la l3gica que sugiere el autor.**

**Uno de los paradigmas de la homeopat3a que marca una diferencia abismal entre 3sta y la farmacolog3a cl3sica occidental, est3 en relaci3n a la concentraci3n del f3rmaco. En 3sta 3ltima, ya en la d3cada del 1920, Alfred J. Clark estableci3 como supuestos fundamentales que el efecto farmacol3gico estaba relacionado directamente con el n3mero de receptores ocupados por el f3rmaco; es decir, a mayor concentraci3n de f3rmaco (mayor dosis) mayor efecto. Por el contrario, uno de los supuestos del paradigma de la homeopat3a, es que el medicamento homeop3tico produce m3s efecto cuanto m3s diluido se encuentra, en una diluci3n infinita. Bajo este precepto, se puede llevar al absurdo de que el efecto homeop3tico en la salud del paciente ser3 m3ximo cuando el medicamento homeop3tico contenga "solo agua". Si bien diluci3n infinita podr3a considerarse como "solo agua", de la rotulaci3n de los medicamentos homeop3ticos se entiende que contienen al menos trazas de elementos en soluci3n. Sugerir3a que el autor no manifestara una opini3n tan tajante de que la homeopat3a es "solo agua" y, que en lugar de ello, dijiese "es una diluci3n infinita". Comentario aparte es el hecho cierto que en Argentina la autoridad sanitaria ha debido caducar la licencia para operar a algunos laboratorios homeop3ticos que envasaban "solo agua" destilada, pu3s a3n por los medios t3cnicos m3s sensibles resultaba imposible detectar ni trazas de los elementos que se indicaban en la rotulaci3n. La excepci3n no es la regla.**

---

**Comentario del Dr. Javier Lozano Garc3a. Jefe de Medicina Preventiva y Salud P3blica. Coordinador de Calidad del Hospital General Yag3e. Burgos. Espa1a.**

**Toda metodolog3a o tecnolog3a "nueva" abre su camino mostrando o informando acerca de sus ventajas, solamente cuando sale de la propiedad de unos pocos (sus descubridores o impulsores), a la utilizaci3n por parte de muchos (los usuarios), se consigue ese paso clave entre la potencial utilidad y la real utilidad.**

**La medicina basada en la evidencia, toma sus cimientos de una ciencia reconocida y consolidada a la que ha popularizado y publicitado, la epidemiolog3a cl3nica y la ha dotado de una serie de instrumentos de gran utilidad pr3ctica, ha incorporado adem3s los grandes avances que el desarrollo tecnol3gico de la inform3tica permite y utiliza principalmente como producto los estudios con mayor nivel de evidencia, los ensayos cl3nicos. Esta alianza ha permitido el gran auge que tras esta nueva forma ha tenido la corriente de la medicina basada en la evidencia.**

**El autor aborda el tema desde el debate existente que aboga por un cambio del paradigma actual, una nueva forma de ejercer la medicina. Repasa de una forma intensa los razonamientos de Kuhn y Popper.**

**Al final todos los razonamientos l3gicos convergen, las ideas (hip3tesis) sobre lo que podr3a ser un tratamiento 3til surgen a partir de cualquier actividad dentro de la medicina y el descubrimiento de nuevos tratamientos requiere tanto de fuentes abundantes de posibilidades prometedoras como**

**métodos de establecer su utilidad.**

**En una palabra, con la experimentación, ponemos a prueba las ideas. Los ejemplos de la teoría de la arteria abierta o de la proteína C activada, que describe el autor, así nos lo ilustran.**

**La conclusión del autor, refleja lo expresado, tal vez no haya un cambio radical en la práctica médica, lo que si hay es un método de sistematización en la adquisición del conocimiento. Indudablemente existen otras formas de adquirirlo, que posiblemente ni sean mejores ni peores, si no mas bien complementarias y que ayuden al clínico inundado por los datos a recoger de una forma sencilla y seria parte de la información necesaria para el cuidado y la atención de sus pacientes.**

---

**Recibido: 6 de abril de 2004.**

**Publicado: 7 de Mayo de 2004**



## CARCINOMA ODONTOGÉNICO DE CELULAS CLARAS. ESTUDIO CLÍNICO, RADIOLÓGICO Y PATOLÓGICO DE UN CASO.

Dr. Reynaldo Falcón-Escobedo\*, Dra. Rosaura Rodríguez Flores\*\*

\* Profesor Titular de la Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina,  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí.  
Jefe del Departamento de Anatomía Patológica, Hospital de Nuestra Señora de la Salud.

\*\* Cirujano Dentista, especialista en Cirugía Máxilo-Facial, Facultad de Estomatología,  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí  
Servicio de Cirugía Máxilo-Facial, Instituto Mexicano del Seguro Social.

San Luis Potosí, S.L.P. México

[falconrfe@hotmail.com](mailto:falconrfe@hotmail.com)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2004;2:46-55

---

[Comentario del Dr. Rodrigo Valdés Annunziata](#) Centro de Diagnóstico Histopatológico y Citopatológico  
Histonor Ltda. Antofagasta, Chile"

[Comentario del Dr. Roberto Cuan Ravinal.](#) Departamento de Patología. Faculdade de Medicina de Ribeirão  
Preto. USP-Ribeirão Preto. Brazil

---

**PALABRAS CLAVE:** Carcinoma Odontogénico de Células Claras (COCC), Tumores Odontogénicos (TO),  
Tumores Odontogénicos de Células Claras (TOCC).

### RESUMEN

Los tumores odontogénicos (TO) son un grupo complejo y poco frecuente de neoplasias con características clínicas, radiológicas, histopatológicas y evolución muy variables. El Carcinoma odontogénico de células claras (COCC) es una neoplasia maligna, de comportamiento agresivo variable que se presenta en maxilares. Histológicamente se constituye de nidos de células, frecuentemente de citoplasma claro, rico en glucógeno, rodeadas por bandas de colágena. Pertenecen al grupo de los tumores odontogénicos epiteliales malignos. Se presenta el caso de un hombre de 57 años con un tumor en hueso y seno maxilar izquierdo, sometido a hemimaxilectomía subtotal izquierda. Los estudios de imagen demostraron una lesión destructiva mixta en maxilar y seno maxilar izquierdo y la histología reveló la imagen clásica de COCC y la inmunohistoquímica mostró inmunoreactividad para Queratina AE1/AE3, EMA y S-100 (focal). Se demostró abundante glucógeno mediante la reacción de PAS en el citoplasma de las células neoplásicas. El paciente ha tenido seguimiento por 5 años y está asintomático después de la cirugía sin tratamiento complementario con radioterapia.

### INTRODUCCIÓN

Los tumores odontogénicos (TO) son un grupo complejo <sup>1,2</sup> y poco frecuente <sup>3,4,5</sup>, de neoplasias, con características clínicas, radiológicas, histopatológicas y evolución muy variables<sup>6</sup>.

[Inicio Home](#)

[Índice del volumen Volume index](#)

[Comité Editorial Editorial Board](#)

[Comité Científico Scientific Committee](#)

[Normas para los autores](#)

[Instruction to Authors](#)

[Derechos de autor Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)





Broca en 1868 propuso la primera clasificación de estos tumores <sup>3</sup>, Thoma en 1940 señaló la existencia de Tumores odontogénicos epiteliales, mesenquimatosos y Mixtos <sup>3</sup> y Gorlin, Chaudhry y Pindborg en 1961 establecieron una clasificación de los Tumores odontogénicos <sup>6</sup> que fue aceptada por la OMS en 1970. Posteriormente, en 1992 se publicó la Clasificación de la OMS<sup>11</sup> y más recientemente en el 2001, el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos (AFIP) editó su clasificación de tumores y quistes de la mandíbula <sup>11</sup> que incluye los tumores odontogénicos.

El carcinoma odontogénico de células claras es una neoplasia muy infrecuente, constituida por células epiteliales con contenido variable de glucógeno que les confiere un citoplasma ópticamente vacío. Algunos tumores pueden contener focos de ameloblastoma convencional o de tumor odontogénico epitelial calcificante <sup>11</sup>

#### INFORME DEL CASO

Hombre de 57 años de edad con aumento de volumen de encía, mucosa vestibular y palatina a nivel de primer premolar superior izquierdo (figura 1) de un año de evolución, posterior a extracción de pieza mencionada.



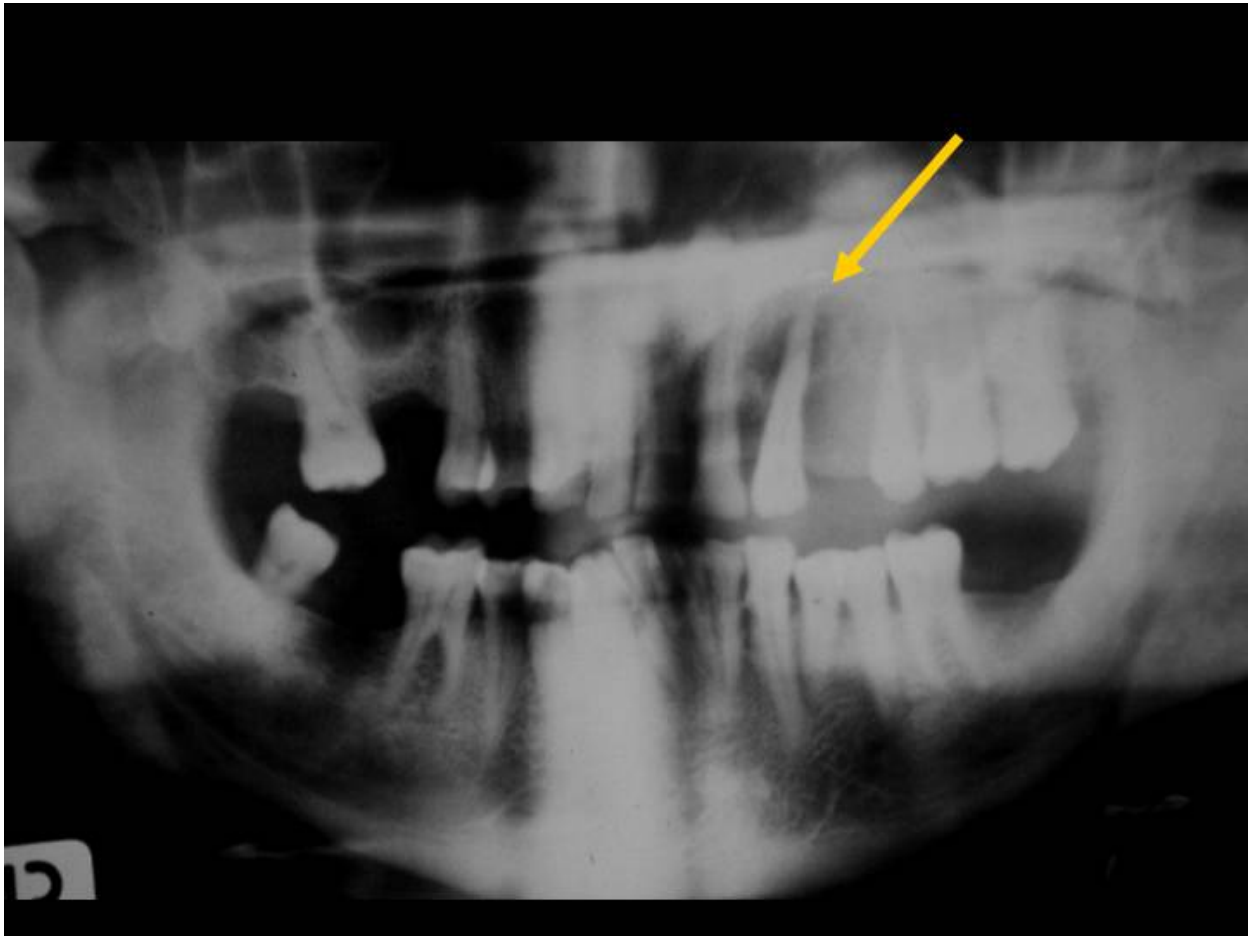
Figura 1

Se realizó biopsia incisional con diagnóstico histológico de "Quiste dentígero". Una revisión de los cortes histológicos en segunda opinión, realizada por nosotros fue diagnosticada como Carcinoma odontogénico de células claras. Posterior a este diagnóstico y derivado del mismo, el paciente fue sometido a hemimaxilectomía izquierda subtotal.

#### Estudios de Imagen

La radiografía panorámica mostró una lesión radiolúcida en la mitad inferior del seno maxilar, desde segundo molar hasta incisivos del mismo lado (figura 2).





**Figura 2**

**La Tomografía Computarizada en cortes coronales reveló una masa bien limitada, confinada a la mitad inferior del seno maxilar, que respetaba el reborde inferior de la órbita (figura 3). En los cortes axiales se observó lesión destructiva mixta del seno maxilar izquierdo (figura 4)**

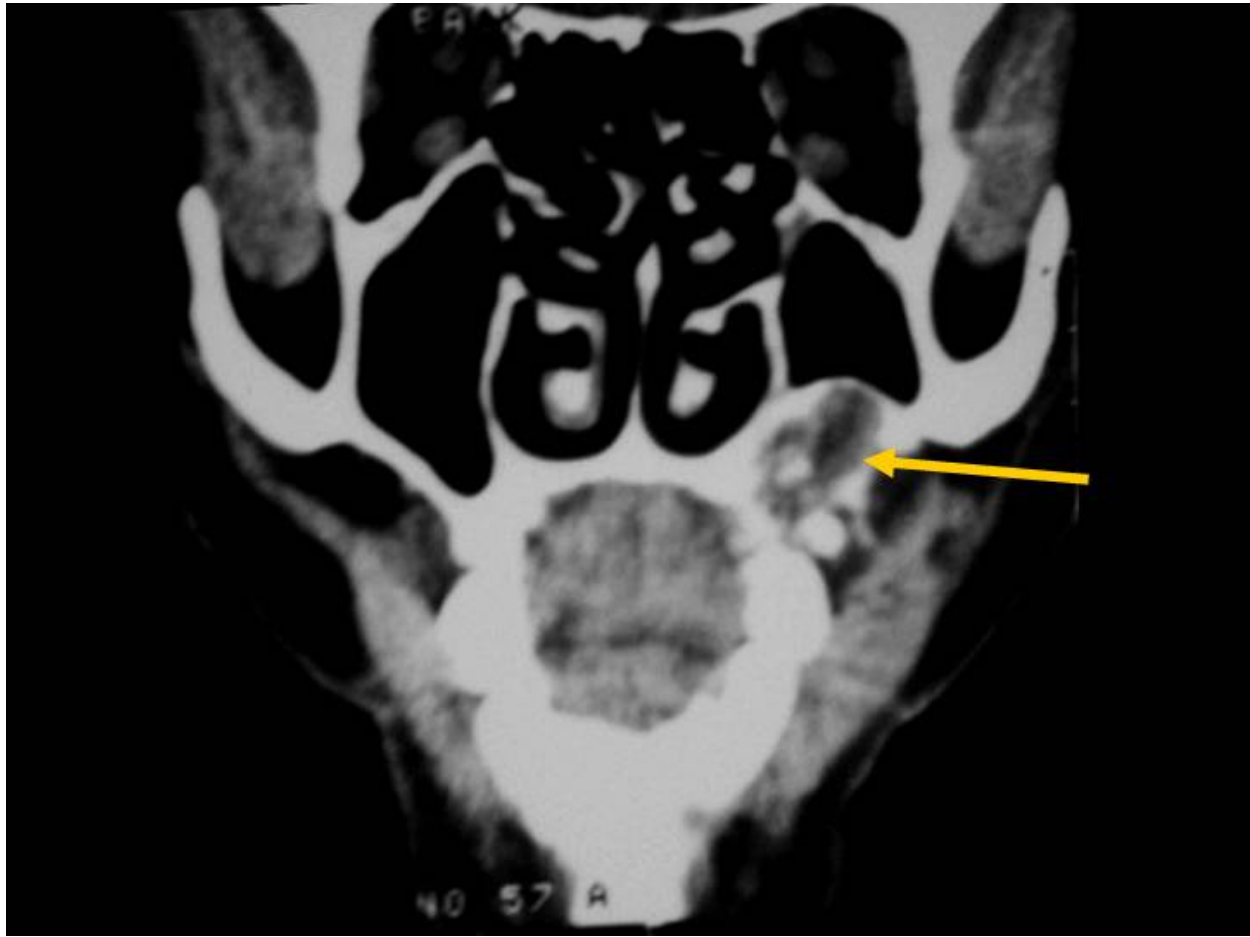


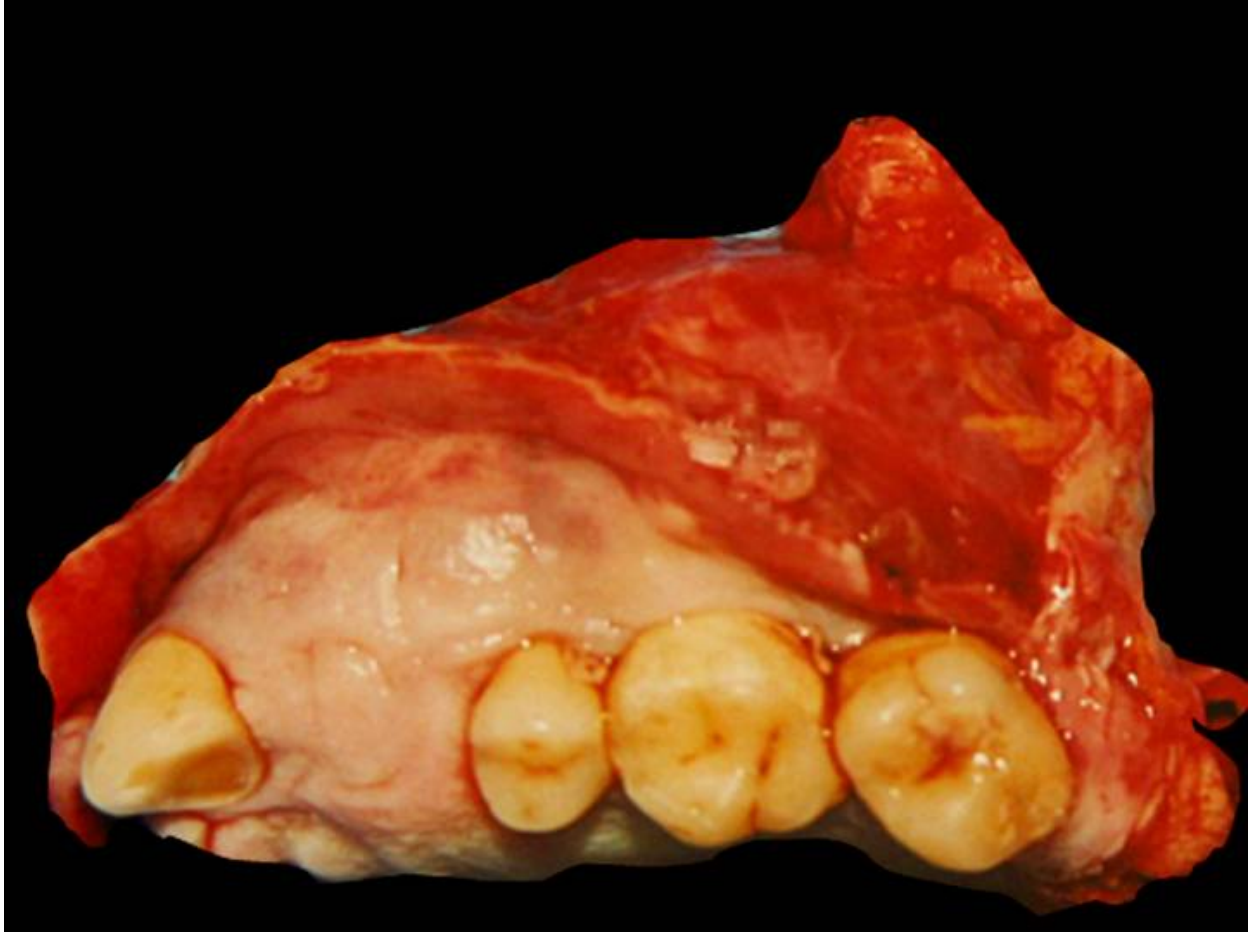
Figura 3



**Figura 4**

**Anatomía Patológica**

Macroscópicamente se estudió espécimen de hemimaxilectomía parcial con aumento de volumen de paladar, encía y mucosa vestibular (figura 5), al corte a expensas de un tumor de 3 x 3 x 2.5 cm., blanquecino, semiblando y friable, con aisladas cavidades quísticas de 0.2 a 0.3 cm. (figura 6).



**Figura 5**



**Figura 6**

**La histopatología mostró nidos neoplásicos con células claras en proporciones variables, baja actividad mitótica, núcleos con aspecto monótono y sin pleomorfismo destacado (figura 7).**



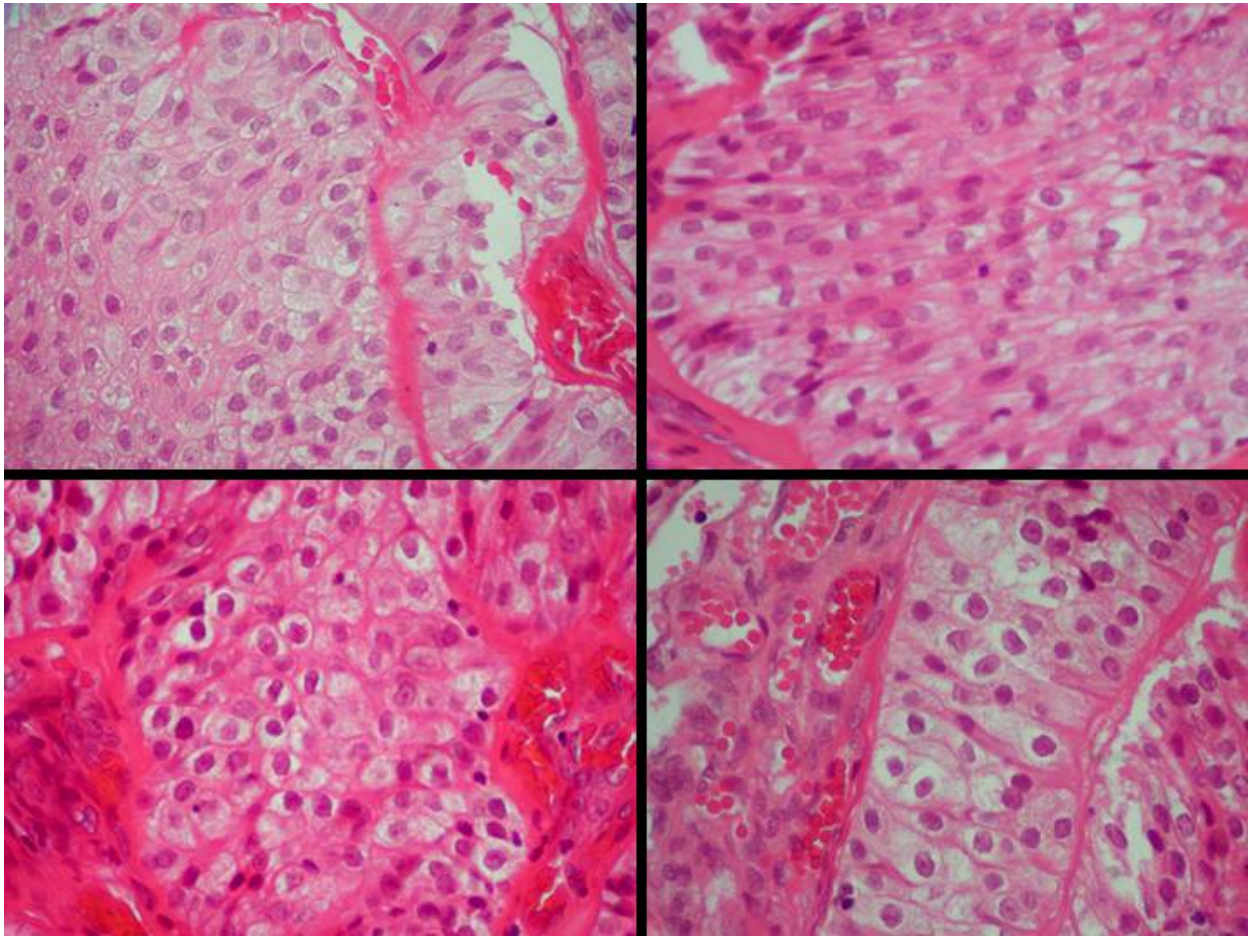


Figura 7

Se realizó estudio de inmunohistoquímica en bloques de parafina, recuperación antigénica en olla de presión, utilización del sistema de detección Estreptavidina-biotina-peroxidasa (Dako) y demostración de la actividad peroxidásica mediante el cromógeno Diaminobencidina (DAB; Sigma, St Louis, MO, USA). Los resultados (figura 8) fueron como sigue:

Anticuerpo	Fuente	Resultado
Queratina AE1/AE3	(Dako)	+++ (multifocal)
S-100	(Dako)	0+
EMA	(Dako)	++
Queratinas 7	(Dako)	-
Queratina 18	(Dako)	-
Queratina $\beta$ E12	(Dako)	-

La reacción de PAS fue positiva con patrón granular citoplásmico, sensible a diastasa (figura 8), que demuestra la presencia de glucógeno.

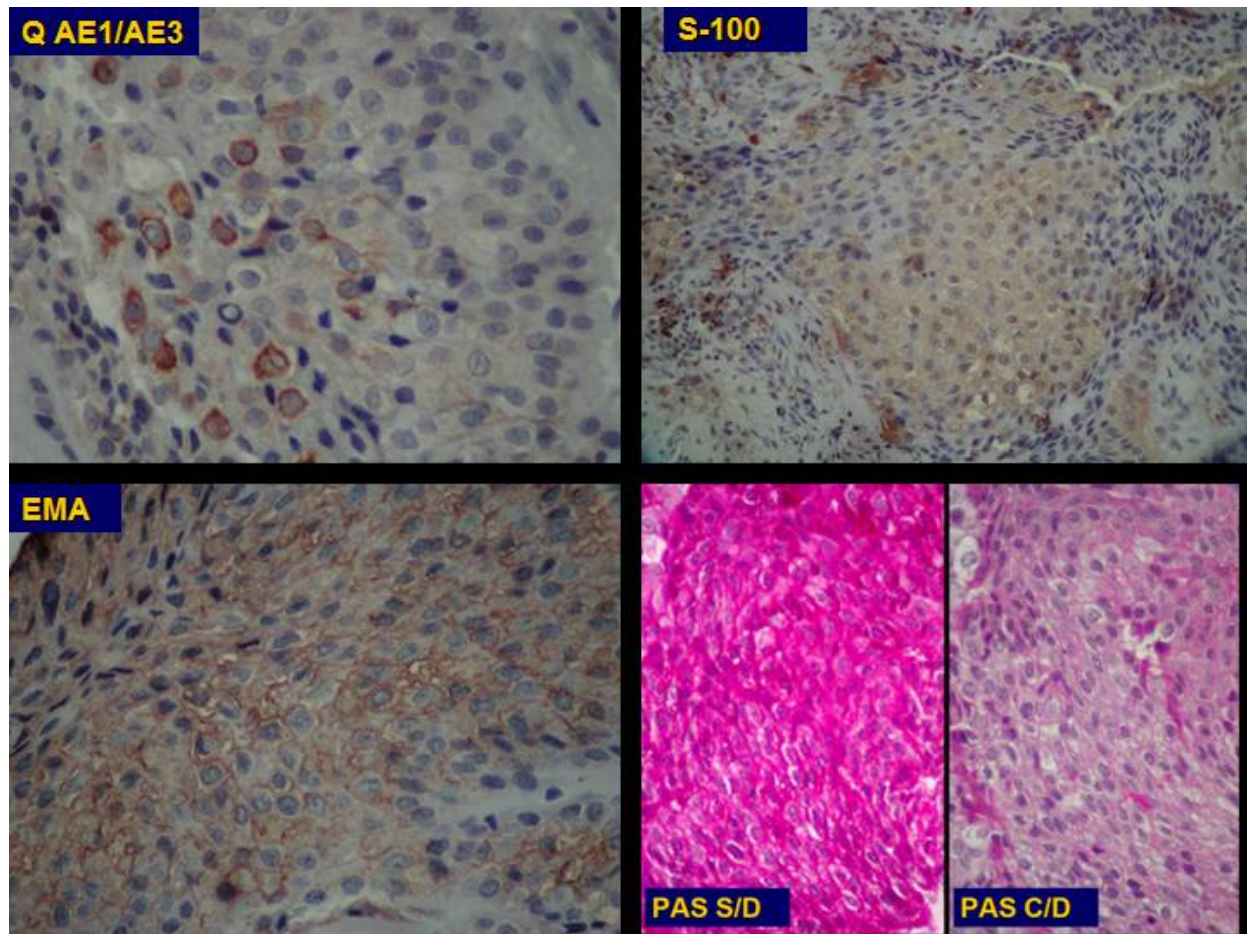


Figura 8

## DISCUSIÓN

El originalmente llamado *Tumor Odontogénico de Células Claras* (TOCC) fue reinterpretado como *Carcinoma Odontogénico de células claras* por la observación de su comportamiento maligno según lo señalan diferentes publicaciones<sup>7,8,9</sup> y adquirió un nuevo sitio en la clasificación aceptada por la OMS y el AFIP en donde se le confiere una definición de malignidad<sup>11</sup>.

Se ha postulado que los tumores odontogénicos epiteliales se pueden originar de diversos tejidos dentales que rodean a un diente que no erupcionó: de los restos epiteliales de Malassez, del revestimiento epitelial de algún quiste odontogénico como puede suceder en los quistes residuales apicales (lesiones periapicales debidas comúnmente a caries dental); puede ser por lesión previa o lesión *de novo*<sup>1,9</sup>.

Los Tumores Odontogénicos son mas frecuentes en hombres entre 20 y 40 años, generalmente se presentan en la mandíbula, en la mayoría se desconoce su etiopatogenia, aunque se ha invocado el posible papel de traumatismos,<sup>12</sup> infecciones<sup>13,14</sup> y retenciones dentarias<sup>15</sup>. No hay evidencia de alteraciones cromosómicas<sup>3</sup>.

El COCC es una neoplasia poco común<sup>6,16-21</sup> variablemente agresiva<sup>17,19-21</sup> que puede presentar recurrencia y metástasis y que histológicamente puede ser confundido con metástasis<sup>20,22-24</sup>. Se ha informado con mayor frecuencia en mujeres mayores de 40 años<sup>22,25</sup>, con predominio en la parte anterior de ambos maxilares<sup>25,26</sup>, aunque con mayor predilección por la mandíbula<sup>20,27</sup>. Se caracteriza por expansión ósea, movilidad dental<sup>1,19</sup> y radiográficamente con cambios en la densidad ósea<sup>3,26</sup>. Algunos autores lo describen con evolución agresiva<sup>28</sup> y puede plantear un dilema diagnóstico para otros<sup>29,30</sup>.

Las características histopatológicas describen pequeños islotes de células claras con citoplasma granular fino, circunscritos por tejido conectivo fibroso. Las células epiteliales basales pueden mostrar empalizadas periféricas, en tanto las células claras son positivas al PAS, sensible a la diastasa, lo que demuestra alto contenido en glucógeno. Los núcleos son ovales, vesiculares o hiper cromáticos<sup>11,31,32</sup>.



La literatura señala que la inmunohistoquímica muestra positividad para pancitoqueratina, citoqueratina 19, antígeno de membrana epitelial; y negatividad para vimentina, proteína S-100, desmina, actina muscular, HMB-45 y alfa antitripsina <sup>11,16,26,27,33,34</sup>.

Por la variable agresividad de esta lesión que se ha señalado que el tratamiento primario de elección es el quirúrgico, con eliminación de la lesión con suficiente margen quirúrgico para evitar su recidiva con opción a radioterapia <sup>3,22,28,35,36</sup>.

El presente caso es típico, solamente llama la atención la discreta positividad de la proteína S-100, no informada previamente en otros trabajos. El paciente ha tenido seguimiento por 5 años y no muestra datos de recurrencia o metástasis, pese a que un borde quirúrgico mostró neoplasia microscópica.

Llamamos la atención acerca de la necesidad del diagnóstico puntual del Carcinoma odontogénico de células claras, el diagnóstico diferencial con lesiones odontogénicas benignas y malignas, así como con neoplasias metastásicas (carcinoma de células claras de riñón) y el potencial comportamiento agresivo de esta neoplasia.

#### BIBLIOGRAFIA:

1. Mosqueda-Taylor A et al: Malignant Odontogenic Tumors. A retrospective and collaborative study of seven cases. *Med Oral*. 2003 Mar-Apr; 8(2): 110-21.
2. Dr. Pere Huguet. Seminario de Patología de Cabeza y Cuello; 21 Congreso de la SEAP, Madrid, del 29 al 31 Mayo 2003.
3. Junquera-Gutiérrez LM, López-Arranz JS, Albertos-Castro JM, De Vicente Rodríguez J.C. Odontogenic Tumors: Classification, clinical features, Diagnosis and Treatment. *Med Oral* 1997;2:94-101.
4. Bhaskar SN. Patología. Buenos Aires. Ateneo 1984.
5. Regezi JA, Kerr DA, Courtney RM. Odontogenic Tumors: analysis of 706 cases. *J Oral Surg* 1978; 36: 771-78.
6. Gorlin RJ, Chaudhry AP, Pindborg JJ. Odontogenic Tumors. Classification histopathology, and clinical behavior in man and domesticated animals. *Cancer* 1961; 14: 73-76.
7. Bang, G, HS Koppang, and LS Hansen, Clear Cell Odont Ca: report of three cases with pulmonary and lymph node metastases . *J. Oral Pathol Med* 1989; 18: 113-118.
8. Eversole LR: Clear Cell Odontogenic Carcinoma. A clinicopathologic analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121: 685-9.
9. Eversole LR et al: Aggressive growth and neoplastic potential of odontogenic cysts with special reference to central epidermoid and mucoepidermoid carcinoma. *Cancer* 1975; 35: 270-82.
10. Prof. José Gudiño, Prof. Alberto Seijas, Alexis Ghanem. Ameloblastoma Follicular. *Acta Odontológica Venezolana* No.41-2-2003.
11. James J. Sciubba, et al. Atlas of Tumor Pathology, Tumors and Cysts of the Jaw, AFIP. Bethesda, Maryland 2001.
12. Gascon FJ, Peydro A, Fons A, Ortenbach J. Tumores Mixtos de Origen Dental: Odontomas. *Revista Iberoamericana de Cirugía Oral y Maxilofacial* 1987; 24: 1-9
13. Junquera LM, Albertos JM, Floriano P, Calvo N, Santos JM. Ameloblastic fibroma: report of two cases. *Int J Paed Dent* 1995; 5: 181-6.
14. Trodahl JH. Ameloblastic fibroma: a survey of cases from The Armed Forces Institute of Pathology. *Oral Surg* 1972; 33: 547-58.
15. Gorlin RJ. Tumores Odontogénicos. En Gorlin RJ, Goldman HM. *Thoma Patología Oral*. Barcelona. Salvat Editores, 1984: 526-62.
16. Tie-Jun Li, PhD, a Shi-Feng Yu, MD, a Yan Gao, PhD a and En-Bo Wang, PhDa. Clear Cell Odontogenic Carcinoma. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*: Vol. 125, No.12, pp 1566-1571.
17. Hansen, LS, LR Eversole, TL Green and NB. Powell. Clear Cell Odontogenic Tumor: a new variant with aggressive potential. *Head Neck Surg* 1985; 8:115-123.
18. Waldron, CA, IA Small and H. Silverman. Clear Cell Ameloblastoma: an odontogenic carcinoma. *J Oral Maxillofacial Surg* 1985; 43: 707-717.
19. August M, Faquin W, Troulis M, Kaban L. Clear Cell Odontogenic Carcinoma: Evaluation of reported cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003 May; 61(5): 580-6.
20. Braunshtein E, Vered M, Taicher S, Buchner A. Clear Cell Odontogenic Carcinoma and Clear Cell Ameloblastoma a single clinicopathologic entity ?. A new case and comparative analysis of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003, Sep; 61 (9): 1004-10.
21. Carinci F, Volinia S, Rubini C, Fioroni M, Francioso F, Arcelli D, Pezzetti F, Piatelli A. Genetic profile of clear Cell Odontogenic Carcinoma. *J Craneofac Surg* 2003 May; 14 (3): 356-62.
22. Brandwein M, Said-Al-Naiel, Gordon R, Urken M. Clear Cell Odontogenic Carcinoma: report of a case and analysis of the literature. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002 Sep; 128 (9): 1089-95.
23. Brinck U, Gunawan B, Schulten HJ, Pinzon W, Fisher U, Fuzei L. Clear Cell Odontogenic Carcinoma with pulmonary metastases resembling pulmonary meningothelial-like nodules. *Virchows Arch*. 2001 Apr; 438(4):412-7.
24. Eversole LR, Duffey DC, Powell NB. Clear Cell Odontogenic Carcinoma, a clinicopathologic analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995 Jun;121(6):685-9.

25. Iezzi G, Rubini C, Fioroni M, Piattelli A. Clear Cell Odontogenic Carcinoma. *Oral Oncol.* 2002 Feb; 38(2): 209-13.
26. Li TJ, Yu SF, Gao Y, Wang EB. Clear Cell Odontogenic Carcinoma: a clinicopathologic and immunocytochemical study of 5 cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Dec; 125(12):1566-71.
27. Mosqueda-Taylor A, Meneses-Garcia A, Ruíz-Godoy Rivera LM, de Lourdes Suarez-Roa M. Clear Cell Odontogenic Carcinoma of the Mandible. *J Oral Pathol Med.* 2002 Aug; 31(7): 439-41
28. Meredith August, William Faquin, Mariatroulis, Leonard Kaban. Clear Cell Odontogenic Carcinoma: Evaluation of reported cases. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* May 2003, Vol 61, Number 5.
29. Dahiya S, Kumar R, Sarkar C, Ralte M, Sharma MC. Clear Cell Odontogenic Carcinoma: A diagnostic dilemma. *Pathol Oncol Res.* 2002; 8(4): 283-5. Epub 2003 Feb 11.
30. Efraim Braunshtein, Marilena Vered, Shlomo Taicher, Amos Buchner. Clear Cell Odontogenic Carcinoma and Clear Cell Ameloblastoma: A single clinicopathologic entity? A new case and comparative analysis of the literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* Sep 2003, Vol 61, Number 9.
31. Piattelli A, Sesenna E, Trisi P. Clear Cell Odontogenic Carcinoma. Report of a case with lymph node and pulmonary metastases. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994 Jul; 30B(4):278-80.
32. Berho M, Huvos AG. Central hyalinizing clear cell carcinoma of the mandible and maxilla a clinicopathologic study of two cases with an analysis the literature. *Hum Pathol.* 1999 Jan; 30(1): 101-5.
33. Kumamoto H, Kauamura H, Ooya K. Clear Cell Odontogenic tumor in the mandible: report of a case with an immunohistochemical study of epithelial cells. *Pathol Int.* 1998 Aug; 48(8): 618-22.
34. Li TJ, Yu SF, Gao Y, Wang EB. Clear Cell Odontogenic Carcinoma: a clinicopathologic and immunocytochemical study of 5 cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Dec; 125(12): 1566-71.
35. Gold L, Upton GW, Marx RE. Standardized surgical terminology for the excision of lesions in bone: an argument for accuracy in reporting. *J Oral Maxillofac Surg* 1991; 49: 1214-1217.
36. Cirugía Bucal y Maxilofacial, Daniel M. Laskin. Editorial Médica Panamericana S.A. 1987.

---

**Comentario del Dr. Rodrigo Valdés Annunziata Centro de Diagnóstico Histopatológico y Citopatológico Histonor Ltda. Antofagasta, Chile"**

Las lesiones de células claras en maxilares no son casos de aparición frecuente y siempre presentan cierta dificultad diagnóstica, obligando a descartar otros orígenes. En el diagnóstico diferencial siempre deben considerarse las lesiones de presentación excepcional, entre las cuales están los carcinomas odontogénicos de células claras, lesiones consideradas de mal pronóstico. El caso reportado por los autores presenta los caracteres histológicos e inmunohistoquímicos característicos, que están muy bien representados en las imágenes adjuntas, las que son de buena calidad y bien seleccionadas, mostrando áreas diagnósticas.

El caso reportado resulta, por tanto, de gran interés para los patólogos quirúrgicos y las referencias y revisión de la literatura realizadas constituyen un aporte, bastante completo, al conocimiento de estos raros tumores. Por otra parte, resulta interesante la evolución clínica favorable de este paciente a pesar de los márgenes quirúrgicos comprometidos. Posiblemente aún debemos ampliar nuestro conocimiento acerca del comportamiento biológico de esta lesión e identificar criterios histológicos o inmunohistoquímicos de utilidad pronóstica. Las series publicadas contienen pocos casos, resultando por tanto de gran interés los reportes de nuevos casos de esta entidad.

---

**Comentario del Dr. Roberto Cuan Ravinal. Departamento de Patología. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. USP-Ribeirão Preto. Brazil**

Tenemos la satisfacción de incluir en nuestra revista un estudio clínico, radiológico y patológico de un caso con diagnóstico de Carcinoma Odontogénico de Células Claras. El Carcinoma Odontogénico de Células Claras es una neoplasia poco frecuente, con un potencial local agresivo.

Este trabajo está redactado de forma amena, está bien organizado y documentado; las referencias bibliográficas son actualizadas y posee una excelente correlación clínico-patológica y radiológica, que sin dudas, despertará el interés de nuestros lectores.

---

Recibido 12 de abril de 2004.  
Publicado: 7 de Mayo de 2004



ISSN: 1697-090X

[Inicio Home](#)

[Índice del volumen Volume index](#)

[Comité Editorial Editorial Board](#)

[Comité Científico Scientific Committee](#)

[Normas para los autores Instruction to Authors](#)

[Derechos de autor Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)



## SINERGISMO FARMACODINÁMICO.

### A PROPÓSITO DE UN CASO INTERVENIDO QUIRÚRGICAMENTE DE URGENCIA BAJO ANESTESIA GENERAL.

**Eustolgio Calzado Marten<sup>1</sup>, Marta Sofia López Rodríguez<sup>2, 3</sup>,  
Marcia Triana Falcon<sup>1, 2</sup>, Yesid Pallares Villarreal<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Hospital Joaquin Albarrán, <sup>2</sup>ISCMH Facultad Finlay Albarrán y <sup>3</sup>Clinica Central Cira García Reyes.  
Ciudad Habana, Cuba

[marlesof@infomed.sld.cu](mailto:marlesof@infomed.sld.cu)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2004;2:56-64.

---

[Comentario del Prof. Martín de Frutos Herranz.](#) Jefe de Medicina Intensiva del Hospital General Yagüe y Profesor de la Escuela Universitaria de Enfermería. Burgos. España.

[Comentario del Prof. Guillermo González Martin.](#) Profesor de Farmacología Clínica, Departamento de Farmacia, Facultad de Química y Farmacia, Pontificia Universidad Católica de Chile.

[Comentario del Prof. José Fuentes Oro.](#) Secretario Académico del Instituto Universitario de Ciencias de la Salud. Fundación Hector A.Barcelo, La Rioja. Jefe del Servicio de la Unidad Coronaria del Sanatorio del Colegio Médico de La Rioja. Argentina

---

**Resumen:** Presentamos una paciente femenina geriátrica con antecedentes de hipertensión arterial y trastornos psiquiátricos intervenida quirúrgicamente de urgencia por un cuadro doloroso abdominal, con una interacción farmacodinámica por sinergismo del doxepin y captopril potenciada por los efectos de la anestesia general. La hipotensión arterial fue la forma clínica de presentación. La paciente se recibió hipotensa por la administración preoperatoria de doxepin tratamiento de base y de captopril tratamiento impuesto por crisis hipertensiva antes de su llegada al hospital.

Después de la inducción de la anestesia general desarrolla hipotensión arterial que sólo responde a la administración de noradrenalina. En un inicio se interpreta como un shock séptico en fase hipodinámica por el cuadro doloroso abdominal y la vasoplejia pero descartadas otras causas se concluye como hipotensión arterial de origen farmacológico con relación a la ingestión de antidepresivos tricíclicos e inhibidores de la enzima convertora de angiotensina I en angiotensina II por su acción sobre el sistema nervioso simpático por potenciada por los agentes anestésicos. La paciente fue dada de alta del hospital satisfactoriamente a los 7 días de operada.

## Introducción

El quince porciento de los ingresos hospitalarios en los pacientes ancianos guarda relación con las reacciones adversas a la administración de fármacos. Los cambios farmacocinéticos, farmacodinámicos y la polifarmacia por la presencia de enfermedades crónicas que se presentan en esta etapa de la vida son factores que hacen susceptible a los ancianos a estas reacciones.<sup>1</sup>

El anciano presenta una declinación linear en la reserva homeostática del organismo lo que causa una disminución de la función de los sistemas cardiaco, respiratorio, y renal. El organismo de cada individuo envejece en diferente grado, estos cambios relativos a la edad son afectados por muchas variables, incluyendo el estilo de vida, la dieta, la actividad física, las enfermedades coexistentes y la predisposición genética.<sup>2</sup>

La interacción farmacológica se presenta cuando la acción de un fármaco administrado para fines de diagnóstico, prevención o curación, es modificada por otro fármaco, por sustancias contenidas en la dieta y/o por condiciones ambientales del individuo. Las interacciones medicamentosas pueden clasificarse de la siguiente forma: interacciones fuera del organismo (incompatibilidades físicas y químicas), interacciones farmacocinéticas, interacciones farmacodinámicas y terapéuticas e interacciones nutrientes-medicamentos.<sup>3-6</sup>

Las interacciones farmacodinámicas y terapéuticas pueden ser por sinergismo que es la facilitación de la respuesta farmacológica por el uso concomitante de dos o más fármacos, el cual puede ser favorable como es el caso de la asociación de un antibiótico bactericida en fase de multiplicación (penicilina) con un bactericida en fase de reposo (estreptomocina), en donde se incrementa la eficacia terapéutica; o desfavorable como el caso del aumento de la depresión del sistema nervioso central al asociar alcohol y drogas depresoras o por antagonismo que resulta en la disminución o anulación de la acción de un fármaco por medio de otro; éste tiene su origen en la competición por receptores de un mismo tipo o diferentes, dependiendo de la naturaleza de los fármacos implicados.

Algunas interacciones medicamentosas deseables se consiguen con el tratamiento conjunto, en el que se utilizan dos o más fármacos para aumentar los efectos terapéuticos o disminuir la toxicidad. Sin embargo pueden aparecer concentraciones excesivamente elevadas o bajas del fármaco afectado o de sus metabolitos, con la consiguiente disminución de eficacia o aumento de la toxicidad. Para predecir la aparición de interacciones y, por lo tanto, minimizarlas o evitarlas, es necesario familiarizarse con la farmacocinética de cada medicamento, las enzimas implicadas en su metabolismo y sus efectos farmacológicos previsibles.

La interacción medicamentosa es importante en la practica anestésica. La anestesia combina diferentes tipos de drogas en los pacientes quirurgicos. Las interacciones durante la anestesia son inevitables y son aun más complicadas cuando se presentan entre las drogas anestésicas y la medicación que toma el paciente. Estas reacciones son potencialmente peligrosas en el periodo perioperatorio y su incidencia aumenta en la población geriátrica que tienen disminuida la capacidad metabólica de los fármacos; adicionalmente estos pacientes mantienen regimenes de tratamientos por las enfermedades coexistentes que presentan lo que incrementa proporcionalmente el riesgo de las interacciones mientras mayor sea el numero de drogas administradas al paciente.<sup>7-11</sup>

**Objetivo:** analizar las interacciones medicamentosas que se producen entre los antidepresivos triciclicos, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina durante la anestesia general.

**Material y método:** se presenta un caso clínico de una paciente femenina de 65 años de edad con peso corporal de 90 Kg y antecedentes de hipertensión arterial tratadas con clortalidona 1 tableta de 25 mg al día, trastornos psiquiátricos controlados con doxepin 150 mg al día.

La paciente es recibida de urgencia en nuestra unidad para ser intervenida por un impacto del cístico. Una hora antes de la llegada al hospital la paciente presento crisis hipertensiva y es tratada por su medico de familia con captopril una tableta 25 mg sublingual y remitido a nuestro hospital En la exploración física encontramos una paciente consciente, astenica, taquicardia de 114 l/min, piel fría, pero los más alarmantes eran las cifras tensionales bajas de 70/40 mmhg, diuresis escasa,

**abdomen doloroso sobre todo en hipocondrio derecho.**

**Se toman medidas generales canalización de vena periférica con branula 14 de grueso calibre, vena profunda yugular interna derecha para la reposición de volumen y monitorización de la presión venosa central. Se decide apoyo con drogas vasoactivas (dopamina a 10 mcg /kg/min) y cobertura antibiótica**

**Se realiza inducción después de mejorar tensión arterial (100/60 mmhg.) lenta con Midazolam 6 mg (0.07 mg/kg de peso corporal) diluido se intuba previa oxigenación con oxígeno 100% y administración de rocuronio 50 mg (0.06 mg/Kg. de peso) y se mantiene con anestesia balanceada oxígeno, óxido nítrico, fentanilo y rocuronio en infusión continua. Se monitoriza electrocardiograma, frecuencia cardíaca, tensión arterial, Saturación de oxihemoglobina (Spo2), presión venosa central, ritmo diurético. Después de la inducción de la anestesia se acentuó la hipotensión arterial. Por lo que se continuó con fluidoterapia pero solo mejora la hemodinámica con la infusión de noradrenalina. Al realizarle la laparotomía la paciente presentaba litiasis vesicular se colescitectomiza pero no se encuentra foco séptico intraabdominal.**

**Posteriormente la paciente desarrolla en el postoperatorio fallo renal agudo de causa prerrenal con elevación de las cifras de creatinina sérica que resuelve tras la normalización de la hemodinamia y la administración de furosemida hasta 10mg/Kg de peso mejorando paulatinamente dada de alta a los 7 días recuperada totalmente.**

**Solución: En primer momento se piensa en shock séptico en fase hipo dinámica por el cuadro doloroso abdominal con posible foco séptico intrabdominal por lo que se instaura tratamiento con fluidoterapia con cristaloideos y coloides, soporte hemodinámico con dopamina a dosis de 10 microgramos/kg/min y cobertura antibiótica mejorando las condiciones hemodinámicas para administrarle anestesia general. Descartadas otras causas de hipotensión arterial se interpreta como hipotensión arterial de origen farmacológico con relación a la ingestión de antidepresivos tricíclicos e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I en angiotensina II potenciada por los agentes anestésicos.**

#### **Discusión:**

**Los pacientes ancianos son fisiológicamente distintos a los jóvenes. Las principales razones fisiofarmacológicas que llevan a una respuesta diferente son: un menor volumen de distribución, menor cantidad de proteínas que se unan a los medicamentos, aumento de la concentración relativa de los medicamentos en relación con los receptores, desaferentación, atrofia neurológica, menor capacidad del hígado para los procesos de desintoxicación y del riñón para eliminación de drogas y sus metabolitos. Todas ellas provocan una mayor sensibilidad a los anestésicos y otras drogas coadyuvantes así como mayor tiempo de acción.<sup>2</sup>**

**La variación en la farmacodinamia de las drogas también explica la mayor o menor sensibilidad de las drogas. Así mismo el geronte consume una mayor cantidad de drogas por patologías asociadas que obligan a conocer las posibles interacciones de las drogas anestésicas.<sup>9</sup>**

**La anestesia general atenúa la respuesta simpaticoadrenal llevando a la reducción de la liberación de renina. Estas variaciones hemodinámicas se deben principalmente a los efectos específicos de los agentes anestésicos en el sistema nervioso autónomo. El bloqueo simpático lleva a la reducción de la capacitancia venosa, disminución del retorno venoso, reducción del gasto cardíaco y severa hipotensión arterial.<sup>12)</sup>**

**Los anestésicos tanto generales como locales producen hipotensión arterial por vasodilatación y disminuyen la contractilidad miocárdica, esta hipotensión arterial es transitoria.<sup>13</sup>**

**Durante la anestesia son frecuentes las situaciones que estimulan el Sistema Renina Angiotensina Aldosterona. Al estar inhibida por los IEAC, la capacidad homeostática del organismo está disminuida y las hipotensiones durante la anestesia se ven potenciadas.<sup>14</sup>**

**En el anciano la disminución de la capacidad de respuesta barorreceptora, junto con la disminución**



de la compliancia arterial, explica la frecuente hipotensión que aparece. La disminución de la capacidad de respuesta barorreceptora retrasa la reacción taquicardia. Aunque la hipotensión se describe aproximadamente en el 20% de los ancianos, su prevalencia es mucho menor en los ancianos sanos.<sup>2</sup>

En el caso que presentamos se produjo un shock por vasodilatación de origen farmacológico como consecuencia de una insuficiencia relativa del volumen intravascular, causada por la interacción farmacodinámica. El volumen sanguíneo circulatorio es normal, pero resulta insuficiente para llenar adecuadamente el corazón. Por debajo de una presión arterial sistémica crítica, los órganos vitales quedarían insuficientemente perfundidos. La disfunción miocárdica secundaria a una perfusión coronaria insuficiente puede complicar el shock por vasodilatación pero en este caso este último mecanismo no es planteable en nuestro caso.

En condiciones normales frente al descenso de la presión arterial se estimulan los corpúsculos carotídeos y aórticos que estimulan el centro vasomotor bulbar lo que activan los mecanismos compensadores con incremento de la actividad adrenergica por liberación de catecolaminas y taquicardia, La reducción de la presión hidrostática en los capilares produce entrada de líquido del intersticio al espacio vascular, la contracción del volumen intravascular activa el sistema renina angiotensina aldosterona, incrementa la liberación de hormona antidiurética y aldosterona esto puede ser suficiente para mantener la presión arterial.<sup>15)</sup>

El doxepin es un antidepresivo tricíclico que produce alteraciones en el movimiento intracelular de sodio durante la fase 0 del potencial de acción, lo que está estrechamente ligado a la liberación de calcio intracelular almacenado, la alteración de la entrada del sodio dentro de la célula miocárdica altera la contractilidad celular lo que da lugar a hipotensión arterial. También depleciona catecolaminas en el miocardio, otro elemento que contribuye a la hipotensión arterial es la vasodilatación arterial por bloqueo alfa adrenergico. También tiene propiedades anticolinérgico por lo que desarrolla taquicardia sinusal dentro de sus efectos.<sup>16-19)</sup>

En estudios se han demostrado episodios hipotensivos en pacientes que se les administró IEAC preoperatoriamente después de la inducción de la anestesia general corroborado en nuestra presentación de caso ya que los IECA bloquean el sistema renina angiotensina aldosterona mecanismo de respuesta del organismo ante situaciones de hipotensión arterial, hipovolemia, hiponatremia, e hiperpotasemia. Al estar bloqueada la capacidad homeostática del organismo no tiene capacidad para contrarrestar los cambios que ante estas situaciones ocurran como los episodios hipotensivos que se presentan después de la inducción de la anestesia en pacientes que previamente toman inhibidores de este sistema.<sup>20-25</sup>

Existe controversia en el uso preoperatorio IEAC para el tratamiento de la hipertensión arterial. Licker por su parte plantea que el tratamiento preoperatorio no influye en la regulación cardíaca autónoma pero Dendorfer confirma que la angiotensina II es capaz de modular el sistema simpático a partir de la medula suprarrenal al despolarizar las células cromafines, con la consiguiente liberación de noradrenalina y adrenalina, inhibición de la recaptación de noradrenalina, incremento de la capacidad de respuesta vascular por tanto al utilizar los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina resulta en una disminución de la concentración de angiotensina y por tanto de la liberación de catecolamina dando lugar a supresión de la respuesta presora ante cambios en la tensión arterial.<sup>26-27</sup>

La hipotensión farmacológica por sinergismo farmacodinámico es resultado de la acción de estos fármacos en el Sistema Nervioso Autónomo. El doxepin depleta catecolaminas en el miocardio y tiene efecto simpaticolítico. Por otro lado, el captopril inhibe la conversión de la angiotensina I en II evitando la liberación de catecolaminas por la medula suprarrenal, de este modo se asocian.

Al realizar la inducción de la anestesia general con midazolam se acentúa la hipotensión arterial por la vasodilatación arterial como consecuencia de la disminución de la resistencia vascular sistémica que inducen las drogas anestésicas lo que potencializa el efecto de las drogas utilizadas.<sup>13</sup>

La hipotensión arterial que responde finalmente a la utilización de noradrenalina reafirma la hipótesis planteada anteriormente.<sup>28-30</sup>



**El fallo en la función renal en nuestra paciente fue de origen prerrenal secundario a la hipotensión arterial marcada que comprometió la perfusión renal como consecuencia de la pérdida de respuesta de la angiotensina II que en situaciones de hipotensión cuando cae la perfusión renal se constriñe la arteriola eferente para conservar la filtración glomerular<sup>31</sup>**

#### **Conclusiones**

- 1. Las interacciones por sinergismo farmacodinámico entre los antidepresivos tricíclicos y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina es por su acción sobre el sistema nervioso simpático acentuado durante la anestesia general por la vasodilatación que producen los agentes anestésicos.**
- 2. La utilización adecuada de las drogas por el anestesiólogo solo es lograda si conocemos la farmacología de los medicamentos utilizados en el manejo del paciente anciano para poder así evitar las interacciones medicamentosas.**

#### **BIBLIOGRAFIA.**

- 1. Jansen PA. Clinically relevant drug interactions in the elderly. Ned Tidschr Geneeskd. 2003;29:585-7**
- 2. Paladino MA, Mercuriali A, Presa C, Bases fisiológicas farmacológicas para la anestesia en los gerontes. Rev Anest Arg. 1996, 54:421-4.**
- 3. Almánzar de Mena R. Medicina al día reacciones adversas e interacciones a medicamentos. Acta Medica Dominicana. 1997;20: 4**
- 4. Alan S, Spielberg S. Principles of therapeutics. En Goodman And Gilman . The pharmacological basis of therapeutics. Ninth edition. 1996:43-61.**
- 5. Marrinson G, Riñón. En Tierney LM, McPhee SJ, Paopadakis MA. Drug clinic and treatment. 1999:654-9.**
- 6. Beers M, Berkov R. Adverse drug reaction. Drug therapy in the elderly. En Merck Manual . 1999. 17ed:2599-2610**
- 7. Bovill JG. Adverse drug interaction in anesthesia. J Clin Anesth. 1997;9:3s-13s.**
- 8. Milde AS, Motsch J. Drug interactions and the anesthesiologist. Anaesthesist. 2003;52(9): 839-59.**
- 9. Naguib M, Magboul MM, Jaroudi R. Clinically significant drug interactions with general anesthetics--incidence, mechanisms and management. Middle East J Anesthesiol. 1997;14(3):127-83.**
- 10. Kuhlmann J, Muck W. Clinical-pharmacological strategies to assess drug interaction potential during drug development. Drug Saf. 2001; 24(10): 715-25.**
- 11. Kubler A. Drug interactions in anesthesiology. Pol Merkuriusz Lek. 2000; 9(51): 598-9.**
- 12. Behnia R, Molteni A, Igie R. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: mechanisms of action and implications in anesthesia practice. Current pharmaceutical design, 2003, 9:763-776.**
- 13. Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. Clinical anesthesia. Philadelphia: Lippincott. 1989.**

14. Larsen JK, Nielsen MB, Jespersen TW. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and anesthesia. *Ugeskr Laeger*. 1996, 21;158(43):6081-4
15. Edwin K, Garrinson J. Renin and Angiotensin. En Goodman And Gilman .The pharmacological basis of therapeutics. Ninth edition. 1996:733-58
16. Jackson WK, Roose SP, Glassman AH. Cardiovascular toxicity of antidepressant medications *Psychopathology* 1987;20 Suppl 1:64-74
17. Baldessairini RS. Drugs and treatment of psychiatric disorder. En Goodman And Gilman .The pharmacological basis of therapeutics. Ninth edition. 1996:439-41
18. García Antidepresivos y anestesia. *Rev. Española de Anest Reanim*. 1997, 34:207-12
19. Guerrero Gómez FJ., Rull JV, Rodríguez Pérez FJ. Intoxicación por Psicofármacos En: Cebrián Gil J, Díaz-Alersi Roseta R, Coma MJ, Gil Bello D. eds. Principios de urgencias, emergencias y cuidados críticos 2000: 8.
20. Barber L, Barrio J, de Rojas MD, Ibanez F, Ano C, Alepuz R, Montero R Refractory hypotension sustained during general anesthesia due to chronic treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Rev Esp Anestesiol Reanim*. 2001 Jan;48(1):34-7
21. Bertrand M, Godet G, Meersschaert K, Brun L, Salcedo E, Coriat P. Should the Angiotensin II Antagonists be Discontinued Before Surgery? *Anesth Analg* 2001;92:26
22. Steven M. Brabant, MD, Michèle Bertrand, MD, Daniel Eyraud, MD, Pierre-Louis Darmon, MD, and Pierre Coriat, MD The Hemodynamic Effects of Anesthetic Induction in Vascular Surgical Patients Chronically Treated with Angiotensin II Receptor Antagonists *Anesth Analg* 1999;89:1388
23. Meersschaert, K., Brun, L., Gourdin, M., Mouren, S., Bertrand, M., Riou, B., Coriat, P. (Terlipressin-Ephedrine Versus Ephedrine to Treat Hypotension at the Induction of Anesthesia in Patients Chronically Treated with Angiotensin Converting-Enzyme Inhibitors: A Prospective, Randomized, Double-Blinded, Crossover Study. *Anesth Analg*. 2002. 94: 835-840
24. Brabant SM, Bertrand M, Eyraud D, Demo P. The Hemodynamic effect of anesthesia induction in vascular surgery patient chronically treated with angiotensin II receptor antagonist. *Anaesth Analg*. 1999.
25. Licker M, Schweizer A, Höhn L, Farinelli C, Morel D R.. Cardiovascular responses to anesthetic induction in patients chronically treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors . *Canadian Journal of Anesthesia* .2000.47:433-440
26. Dendofer A, Raasch W, Tempel K, Domoniniak R. Interaction between the renin-angiotensin system and the sympathetic system. *Basic Res Cardiol*. 1998, 93;28-9.
27. Teba L, Schiebel F, Dedhin HV, Lazzell VA. Beneficial effect of norepinephrine in the treatment of circulatory shock caused by tricyclic antidepressant overdose. *Am J. Emerg Med*. 1988, 6:566-8.
28. Lyon D, Roy S, O'Byrne, Swift CG. ACE inhibition: postsynaptic adrenergic sympatholytic action in men. *Circulation*. 1997;96:911-5.
29. Boda S, Solsona J, Papaceit J. Hipotensión por bloqueo simpático refractario a efedrina

en un paciente con tratamiento crónico con ADT. *Revista Española de Anest Reanim*, 1999,46:364-7.

30. Tran TP, Panacek Ea, Rhec Kj, Folke GE. Response to dopamine vs norepinephrine in tricyclic antidepressant induced hypotension. *Acad Emerg Med*. 1997;:364-7

31. Cassinello Ogea C, Giron Nombiela JA, Ruiz Tramazaygues J, Izquierdo Villarroya B, Sanchez Tirado JA, Almajano Dominguez RM, Oro Fraile J. Severe perioperative hypotension after nephrectomy with adrenalectomy *Rev Esp Anestesiol Reanim*. 2002 Apr;49(4):213-

---

**Comentario del Prof. Martín de Frutos Herranz. Jefe de Medicina Intensiva del Hospital General Yagüe y Profesor de la Escuela Universitaria de Enfermería. Burgos. España.**

La evolución sanitaria en la sociedad occidental actual permite el control de pacientes portadores de patologías crónicas, que bajo tratamiento continuado les permiten una calidad de vida suficiente.

Los ancianos están habitualmente sometidos a medicación de forma continuada. Las enfermedades cardiovasculares, respiratorias, metabólicas, osteoarticulares, y otras, implican la administración de múltiples fármacos.

Las actuaciones urgentes que requieren estos pacientes, como las intervenciones quirúrgicas, se hacen por tanto en situación de impregnación farmacológica.

El caso presentado por el Dr. Calzado y colaboradores pone de relieve la actualidad del problema con el que frecuentemente se encuentran los anesthesiólogos. Las dificultades de control en el intra y postoperatorio supone un reto para los conocimientos de interacciones farmacológicas en los enfermos con urgencias quirúrgicas como bien manifiesta la presentación de este caso clínico,

---

**Comentario del Prof. Guillermo González Martín. Profesor de Farmacología Clínica, Departamento de Farmacia, Facultad de Química y Farmacia, Pontificia Universidad Católica de Chile.**

Los autores exponen el caso de una paciente de 65 años, al parecer obesa, con antecedentes de hipertensión arterial tratada con clortalidona 25 mg al día y doxepina 150 mg al día por un trastorno psiquiátrico. La paciente desarrolla una crisis hipertensiva que es tratada con captopril 25 mg por vía sublingual presentando un cuadro de hipotensión de 70/40 mm, la que se acentuó después de la inducción de la anestesia.

Los autores discuten en forma amplia y completa el posible mecanismo de la interacción sinérgica de los anestésicos y los inhibidores de la ECA en relación con la hipotensión presentada por la paciente antes y durante el procedimiento quirúrgico. Un aspecto importante y que los autores no mencionan en este documento, es la crisis hipotensiva que la paciente presenta antes de la cirugía y después de la utilización de captopril sublingual. La paciente recibió una dosis única de Captopril por vía sublingual, que al parecer fue el medicamento responsable de la hipotensión.

Se describe en la literatura que los inhibidores de la ECA producen hipotensión, especialmente en aquellos pacientes que reciben las primeras dosis. Los factores de riesgo que predisponen a esta disminución brusca de la tensión arterial, son las alteraciones electrolíticas (depleción salina), pacientes hipovolémicos, hipertensión severa y de edad avanzada. En este caso no se entregan valores de laboratorio para inferir si la paciente presentaba algún grado de trastorno electrolítico, pero se podría pensar que el uso de la clortalidona, un diurético tiazídico, de vida media prolongada

y en dosis que la paciente ingería nos haría suponer, que habría algún grado de hiponatremia, que predispuso a este paciente al episodio de hipotensión.

Varias publicaciones refrendan esta hipotensión con la primera dosis de inhibidores de la enzima convertidora. Así los estudios de ISIS-4 <sup>1</sup> y Packer y col.<sup>2</sup>, muestran que el 5% de los pacientes tratados tuvieron que suspender el tratamiento como consecuencia de la hipotensión severa observada con la primera dosis de 6,25 mg de captopril y 10 mg de enalapril. Este efecto, aumenta el riesgo de caídas, infartos al miocardio y accidentes vasculares. También se ha encontrado una correlación positiva entre la ingesta de la primera dosis de un iECA y mortalidad<sup>3</sup>.

Los pacientes más ancianos están especialmente en riesgo, presumiblemente debido a una alteración de los mecanismos adaptativos y de las funciones de autoregulación. Para prevenir la hipotensión inducida por la primera dosis de un iECA se aconseja suspender los diuréticos 24 a 48 horas antes de administrar el fármaco e iniciar el tratamiento con dosis bajas de captopril o enalapril. Al parecer existen diferencias clínicamente relevantes entre los iECAs frente a la hipotensión. Algunos estudios han demostrado que perindopril causa menos hipotensión que captopril, enalapril o lisinopril.<sup>4</sup>

Contribuyó también a una potenciación del efecto hipotensor del captopril, el uso de doxepina, un antidepresivo tricíclico, que además de inhibir la recaptación de serotonina y noradrenalina es uno de los más potentes antagonista de los receptores H1 de histamina, acción que se traduce en sedación en el paciente. Además tiene el potencial de desarrollar hipotensión ortostática, especialmente en los pacientes de edad avanzada. Todas estas características hacen de este medicamento, inapropiado para ser administrado en el adulto mayor<sup>5</sup>.

La prescripción inapropiada de medicamentos en el anciano, es un problema mundial que está recibiendo más atención en los últimos años. Las consecuencias de utilizar este tipo de medicamento, puede ejemplificarse en este caso, en el cuál contribuyó a que el paciente desarrollara una hipotensión arterial severa.

#### Referencias:

- 1.- ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival). Collaborative Group. A randomised trial assessing early oral captopril, oral mononitrate and intravenous magnesium sulfate in 58.050 patients with suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1995; 345:669-685.
- 2.- Packer M, Lee WH, Yushak M et al. Comparison of captopril and enalapril in patients with severe chronic heart failure. *N. Engl J Med*, 1986; 315: 847-853.
- 3.- Swedberg K, Held P, Kjeksus J et al. Effects of the early administration of enalapril on mortality in patients with acute myocardial infarction. Results of the Cooperative New Scandinavian Enalapril Survival Study II. *N Engl J Med* 1992; 327:678-684.
- 4.- Jansen P, De Vries O et al. Blood pressure reduction after the first dose of captopril and perindopril. *J Am Geriatr Soc*, 2001; 49(11); 1574-1575.
- 5.- Lance T, Browning S, et al. A database analysis of potentially inappropriate drug use in an elderly medicare population. *Pharmacotherapy* 2000, 20: 221-228.

---

Comentario del Prof. José Fuentes Oro. Secretario Académico del Instituto Universitario de Ciencias de la Salud. Fundación Hector A.Barcelo, La Rioja. Jefe del Servicio de la Unidad Coronaria del Sanatorio del Colegio Médico de La Rioja. Argentina

La publicación de casos clínicos tiene por objetivo advertir sobre la existencia de entidades nosológicas infrecuentes ("raras") y aportar nuevos datos para el conocimiento de las mismas. También estas comunicaciones tienen por objetivo advertir sobre comportamientos fisiopatológicos no conocidos por ejemplo, interacción de drogas, efectos no descritos de drogas sobre el organismo humano, etc. Esta comunicación presenta un caso clínico de sinergismo farmacológico entre

**antidepresivos tricíclicos y captopril en paciente anciana intervenida quirúrgicamente de urgencia.**

**Consideraciones apropiadas sobre el comportamiento fisiopatológico del anciano son descritos con acierto. Un minucioso relato del caso clínico, las intervenciones terapéuticas realizadas y los conceptos farmacológicos expuestos por los autores, permiten decir que el trabajo es novedoso y seguramente los lectores encontrarán en él respuestas a muchas situaciones de su actividad cotidiana como médicos.**

**También es dable destacar que la bibliografía presentada es suficiente y actualizada, permitiendo profundizar los conocimientos a quien lo desee.**

---

**Recibido: 22 de mayo de 2004 .  
Publicado: 14 de Julio de 2004**





ISSN: 1697-090X

[Inicio Home](#)

[Indice del  
volumen Volume  
index](#)

[Comité Editorial  
Editorial Board](#)

[Comité Científico  
Scientific  
Committee](#)

[Normas para los  
autores  
Instruction to  
Authors](#)

[Derechos de autor  
Copyright](#)

[Contacto/Contact:  
!\[\]\(cf531ed27e91483460120fcc057b3901\_img.jpg\)](#)

## ACUTE RENAL FAILURE WITH NORMAL PLASMA UREA LEVELS: a Marker of Proximal Tubular Disfunction with Diabetes Insipidus

Case report

Musso CG<sup>1, 2</sup>, Giordani C<sup>1</sup>, Stonski E<sup>2</sup>, Peralta M<sup>2</sup>,  
Bonetto A<sup>2</sup>, Jauregui R<sup>2</sup>, Algranati L<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nephrology Department & <sup>2</sup>Centro Agustin Rocca  
Hospital Italiano de Buenos Aires-Argentina

[carlos.musso@hospitalitaliano.org.ar](mailto:carlos.musso@hospitalitaliano.org.ar)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2004;2:65-68

---

[Comment Reviewer Dr Omar Abboud](#). Consultant Nephrologist, Hamad Medical Corporation, Doha, Qatar.

[Comment Reviewer Jesús Garrido MD](#). Unidade de Nefrologia e Diálise. Hospital São Teotónio de Viseu. Viseu. Portugal.

---

### INTRODUCTION

Approximately 8% to 26% of patients who receive an aminoglycoside for more than several days will develop mild renal impairment that is almost always reversible. The toxicity results from accumulation and retention of these drugs in the proximal tubular cells<sup>1</sup>.

In the following case report we present a particular pattern of acute renal failure documented in a patient treated with the aminoglycoside amikacin.

### CASE REPORT

A 23 year-old woman was referred to our Nephrology Department presenting elevated serum creatinine levels in the context of normal serum urea.

Three month before admission she had suffered a fracture of her first and fourth lumbar vertebrae as a consequence of a car crash. In order to stabilize her spinal column, she had had to undergo an operation. Unfortunately she had developed a wound abscess. It was then when she was referred to our hospital where she had to be operated again. Bone samples were obtained and they confirmed the presence of an acute osteomyelitis secondary to *Pseudomonas Aeruginosa* and metil-resistance *Staphylococcus Aureus*. Intravenous vancomycin 2 g/day, amikacin 1 g/day, piperacilin 16 g/day were prescribed.

After a month of treatment with this antimicrobial schedule an increase in her plasma creatinine level was detected: 1.2 mg/dl (initial value: 0.9 mg/dl). This acute renal failure was a non-oligoanuric one: diuresis: 4000 cc/day, and with low osmolality urine: 210 mosm/l. The antibiotic schedule was changed to a non nephrotoxic one and daily blood samples

were taken to check urea and creatinine plasma levels. The patient had neither liver disease nor a low-protein diet. Her nutritional parameters were within the normal range, with a height and weight of 1.64 m and 61 kg respectively.

We appreciated a progressive increase in plasma creatinine levels without a significant alteration in plasma urea ones. Even more, the lowest plasma urea level (22 mg/dl) was detected when the highest plasma creatinine level (2.6 mg/dl) was documented (Table I).

TABLE 1: Substance Levels During Hospital Admission

	Admission day	15th day	17th day	18th day	19th day	20th day	30th day	40th day	Normal Values
Plasma Urea (mg/dl)	39	22	34	34	40	47	35	34	20-40
Plasma Creatinine (mg/dl)	1	2.6	1.9	1.9	2.1	1.8	1.1	1	0.8-1
Plasma Sodium (mmol/l)	135	140	139	139	139	140	136	137	135-145
Plasma Potassium (mmol/l)	4.1	3.8	3.2	4.2	5.1	4.6	3.8	3.9	3.5-5.5
Fraccional Excretion of Sodium (%)			11	17	17	9.4	1	1	0.5-1%
Fraccional Excretion Potassium (%)			44	59	44	36	27	14	10-15%
Fractional Excretion of Urea (%)			103	84	76	55	61	60	36-64%

Aiming at explaining this phenomenon we measured urea and creatinine in blood and urine samples in order to calculate the fractional excretion of urea (FEU). As we can appreciate in Table I, fractional excretion of urea was excessively high (FEU: 103%), meaning that this substance was markedly excreted, phenomenon that could explain the paradoxical normal plasma urea level in the context of an acute renal failure.

Since nephrotoxic drugs were removed, the acute renal failure progressively healed normalizing plasma creatinine values.

## DISCUSSION

The acute renal failure previously described could be caused by two potential mechanisms: bone infection and nephrotoxic antibiotics. However, since renal deterioration begun after these drugs were initiated and their remotion led to a clear renal function recovery we considered antibiotics as the main cause of this disturbance. Even though the three antibiotics prescribed in this case are potentially nephrotoxic<sup>2</sup>. Amikacin, an aminoglycoside, is the most nephrotoxic of them<sup>3</sup>.

Aminoglycosides undergoes renal excretion by glomerular filtration, although a small percentage of filtered drug is reabsorbed proximally. This reabsorption is done by pinocytosis through apical surface of tubular epithelial cells causing later perturbation of mitochondrial integrity and disruption of lysosomes into the proximal tubular cells<sup>4, 5</sup>. Aminoglycosides toxicity is mediated by necrotic and non-necrotic (apoptotic) mechanisms<sup>5</sup>. Parenchymal accumulation within the renal cortex occurs with these agents with tissue concentrations exceeding serum levels several fold, and on this tissue accumulation is based aminoglycoside proximal tubule toxicity<sup>3</sup>. However, dissociation between tissue accumulation and preservation of renal function has been reported<sup>4</sup>.

Aminoglycosides may alter urinary concentration mechanisms and also reduce collecting tubule response to antidiuretic hormone<sup>3</sup>. The previous described statements could explain the low-osmolality polyuria documented in our patient.

The striking point of this case is the presence of normal plasma urea level in a context of renal insufficiency. In this case it could not be explained by the existence of a low muscle mass as she was neither malnourished nor small built

or old.

In normal physiologic conditions, about 50% of the filtered urea is invariably reabsorbed in the proximal convoluted tubule. Some urea must also be reabsorbed in part of the distal nephron located in the cortex. Given the high cortical blood flow and the vascular-tubular organization in this area of the kidney, it seems highly unlikely that any of this urea could be reintroduced in the nephron lumen. Thus, at least 50% of the filtered urea cannot be excreted. Because of that fractional excretion of urea higher than 50% could mean urea reabsorption alteration or urea secretion. Since most of urea reabsorption is done in proximal tubules, area damaged by amikacin, a reduced proximal urea reabsorption could explain part of the high FEU found in this case<sup>6, 7, 8</sup>. The concomitantly elevated fractional excretion of sodium and potassium reinforce the hypothesis of an alteration of tubular reabsorption mechanisms.

Besides, since high urinary rate is another cause of increased urea excretion, the documented water diuresis in our patient, secondary to nephrogenic diabetes insipidus, could be another reason of her high FEU<sup>6</sup>.

Regarding creatinine, its high plasma levels could be not only explained by its reduced filtration (acute renal failure), but also by an alteration in its secretion due to amikacin-induced proximal toxicity.

## CONCLUSION

Acute renal failure with normal urea plasma levels, in case of a young properly nourished patient, could be a marker of proximal tubular dysfunction with diabetes insipidus.

## REFERENCES:

- 1.- Chambers H. The aminoglycosides. In Goodman Gilman A, Limbird LE, Hardman JG (Eds). The pharmacological basis of therapeutic. New York. Medical Publishing Division. 2002: 1229
- 2.- Lacy C, Armstrong L, Goldman M, Lance L. Drug information handbook Hudson. Lexi-Comp; 2003: 1115-1116.
- 3.- Ahijado FJ, Garcia S. Nephrotoxic Acute Renal Failure. In Liaño F, Pascual J. (Eds). "Acute renal failure". Barcelona. Masson.2000: 139-170.
- 4.- Swan S, Bennett W. Nephrotoxic acute renal failure. In Lazarus JM, Brenner BM (Eds).Acute renal failure. New York. Curchill Livingstone. 1993: 361-4.
- 5.- El Mouedden M, Laurent G, Mingot-Leclercq MP, Taper H, Cumps J, Tulkens. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low dosis of aminoglycosides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2000; 44: 665-675.
- 6.- Bankir L, Tinh-Trang-Tan MM. Urea and the kidney. Philadelphia. W. B. Saunders Company. 2000: 637-652.
- 7.- Kokko J. Overview of renal physiology. In Kokko J, Tannen R (eds). Fluids and electrolytes. Philadelphia. W.B Saunders Company. 1996: 855-856
- 8.- Kaplan A, Kohn O. Fractional excretion of urea as a guide to renal dysfunction. Am J Nephrol 1992; 12: 49-54

---

Comment Reviewer Dr Omar Abboud. Consultant Nephrologist. Hamad Medical Corporation, Doha, Qatar.

Over all, the article is well presented. The proposed mechanism to explain the normal urea in the face of an elevated serum creatinine in a patient with acute renal failure is logical, and reasonably supported by the evidence given. There are a few comments, below, to be taken in consideration:

Two potential mechanisms were proposed for the acute renal failure: infection and nephrotoxic antibiotics. It was assumed that drugs were the cause as the renal failure started after initiation of therapy and resolved after discontinuation of the drugs. Although I agree with the assumption, infection could have been the cause: leading to renal failure which resolved with the clearance of the infection with antibiotics. The possibility of multiple factors also

cannot be ruled out.

Factors producing low urea were referred to by mentioning that the patient had no liver disease, low protein diet or malnutrition, but the factor leading to disproportionately high creatinine in relation the urea was not alluded to: i.e. excessive muscle damage produced by the abscess.

---

Comment Reviewer Jesús Garrido MD. Unidade de Nefrologia e Diálise. Hospital São Teotónio de Viseu. Viseu. Portugal

Musso et al. describe an interesting case report, in which drug nephrotoxicity, especially by amikacin, course with an acute renal failure with normal plasmatic urea levels.

Aminoglycosides are prototype drugs having nephrotoxicity as major side effect. Number of patients developing nephrotoxicity increases with duration of therapy reaching 50% with 14 days or more of treatment. Classically it presents as acute tubular necrosis which is generally non-oliguric. Other features include: proximal tubular dysfunction, enzymuria, proteinuria, glycosuria, hypokalemia, hypomagnesemia... Recovery is slow and requires 4-6 weeks.

Despite its nephrotoxic potential, the aminoglycosides antibiotics are still considered an important agent against life-threatening infections. The goal of identifying and reducing this toxicity has attracted much effort during the last years. A precise monitoring of proximal tubule function to discover the early renal injury could avoid worst consequences. A fast marker of tubular dysfunction in this pathology is the urinary N-acetyl-B-D-glucosaminidase (NAG) activity, that increase in case of proximal tubular damage. Several nephrotoxicity-ameliorating agents have been described with more or less efficiency as: beta-blockers, Vitamins, antioxidants (a garlic derived compound S-allylmercaptocysteine, trans-resveratrol...), antiplatelet drugs (trapidil), melatonin, ...

The nephrotoxicity of these drugs is frequent but this case is unusual. The interest of this case is the possibility of getting one more proximal tubular damage marker to identify as soon as possible the renal toxicity.

---

Received: June 18, 2004.

Received revised July 28, 2004

Published: July 31, 2004



ISSN: 1697-090X

[Inicio Home](#)

[Índice del  
volumen Volume  
index](#)

[Comité Editorial  
Editorial Board](#)

[Comité Científico  
Scientific  
Committee](#)

[Normas para los  
autores  
Instruction to  
Authors](#)

[Derechos de autor  
Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)



## INSUFICIENCIA RENAL AGUDA CON UREA PLASMATICA NORMAL: Un Marcador de Disfunción Tubular Proximal y Diabetes Insípida

Caso Clínico

Musso CG<sup>1, 2</sup>, Giordani C<sup>1</sup>, Stonski E<sup>2</sup>, Peralta M<sup>2</sup>,  
Bonetto A<sup>2</sup>, Jauregui R<sup>2</sup>, Algranati L<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Nefrología y <sup>2</sup>Centro Agustin Rocca  
Hospital Italiano de Buenos Aires-Argentina

[carlos.musso@hospitalitaliano.org.ar](mailto:carlos.musso@hospitalitaliano.org.ar)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2004;2:69-73.

---

[Comentario del Dr Omar Abboud.](#) Consultant Nephrologist, Hamad Medical Corporation, Doha, Qatar.

[Comentario del Dr. Jesús Garrido.](#) Unidade de Nefrologia e Diálise. Hospital São Teotónio de Viseu. Viseu. Portugal.

---

### INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 8% a 26% de los pacientes que reciben un aminoglucósido por un período mayor a varios días, desarrollan una insuficiencia renal leve que suele ser casi siempre reversible. La toxicidad por aminoglucósidos es producto de la acumulación y retención de dicha droga en los túbulos renales proximales <sup>1</sup>.

En el siguiente caso describiremos un curioso patrón de insuficiencia renal aguda documentado en un paciente tratado con el aminoglucósido amikacina.

### CASO CLÍNICO

Nos fue solicitado evaluar a una paciente mujer de 23 años por presentar insuficiencia renal aguda con urea plasmática normal. No era hepatópata ni poseía reducción significativa de su masa muscular. Tampoco era vegetariana y sus parámetros nutricionales eran normales, siendo su talla y peso de 1,64 m y 61 kg respectivamente.



Tres meses antes de su internación en nuestro hospital había sufrido una fractura de su primera y cuarta vértebras lumbares como consecuencia de un accidente de tránsito. Se le realizó una cirugía para estabilizar la columna vertebral. Desafortunadamente desarrolló un absceso en la herida quirúrgica. Fue entonces derivada a nuestro hospital donde tuvo que ser reintervenida quirúrgicamente. En dicha cirugía fueron tomadas muestras de hueso para estudio patológico y cultivo. Estos estudios confirmaron el diagnóstico de osteomielitis aguda secundaria a *Pseudomona Aeruginosa* y *Stafilococcus Aureus* metilicina-resistente.

Un esquema antibiótico compuesto por vancomicina 2 gramos/día, amikacina 1 gramo/día y piperacilina 16 gramos/día fue prescripto. Luego de 1 mes de tratamiento fue detectado un aumento en la creatinina plasmática: 1.2 mg/dl (siendo su valor basal 0.9 mg/dl). La insuficiencia renal aguda tenía un patrón no oligoanúrico (diuresis 4000 cc/día), con orina hipotónica (210 mOsm/l). A raíz de la presencia de insuficiencia renal aguda el esquema antibiótico fue rotado a uno no nefrotóxico y muestras de sangre y orina fueron tomadas diariamente a fin de monitorizar los valores de urea y creatinina.

Se detectó un aumento progresivo en los niveles de creatininemia sin una alteración significativa en los de uremia. Incluso el valor de uremia más bajo (22 mg/dl) fue detectado en el momento en que la paciente tenía su creatininemia más elevada (2.6 mg/dl) (Tabla I).

**TABLA 1: Valores de laboratorio durante la internación**

	Día de ingreso	Día 15	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 30	Día 40	Valor normal
Uremia (mg/dl)	39	22	34	34	40	47	35	34	20-40
Creatinina Sérica (mg/dl)	1	2.6	1.9	1.9	2.1	1.8	1.1	1	0.8-1
Natremia (mmol/l)	135	140	139	139	139	140	136	137	135-145
Potasemia (mmol/l)	4.1	3.8	3.2	4.2	5.1	4.6	3.8	3.9	10-15
Excreción Fraccional de Sodio (%)			11	17	17	9.4	1	1	0.5-1
Excreción Fraccional de Potasio (%)			44	59	44	36	27	14	10-15
Excreción Fraccional de Urea (%)			103	84	76	55	61	60	36-64

Con el objetivo de explicar este fenómeno, fueron medidos en sangre y orina creatinina y urea a fin de poder calcular la excreción fraccional de urea (EFU). Como se puede apreciar en la Tabla I, la EFU fue muy alta (EFU: 103%), significando que esta sustancia era excretada en grandes cantidades, fenómeno que explicaría nuestro hallazgo de urea plasmática normal en el contexto de una insuficiencia renal aguda.

A partir de que las drogas nefrotóxicas fueron removidas la insuficiencia renal mejoró progresivamente normalizando su creatininemia.

## DISCUSIÓN

La insuficiencia renal aguda antes descrita podría haber sido provocada por dos causas potenciales: la osteomielitis aguda y los antibióticos nefrotóxicos. Sin embargo, si se tiene en cuenta que el deterioro renal comenzó después de su uso, y su remoción condujo a la recuperación del fracaso renal, dichos antibióticos pueden ser considerados los principales causantes de la insuficiencia renal. A pesar de que los tres antibióticos son potencialmente nefrotóxicos<sup>2</sup>, la amikacina, un aminoglucósido, es el más nefrotóxico de todos ellos<sup>3</sup>.

El aminoglucósido es excretado por filtración glomerular, aunque un pequeño porcentaje de la droga filtrada es reabsorbida en los túbulos proximales. Esta reabsorción es hecha por pinocitosis a través de la superficie apical de las células tubulares proximales. Una vez en el interior de la célula, el aminoglucósido perturba la integridad de las mitocondrias y los lisosomas<sup>4, 5</sup>. La toxicidad por estos antibióticos está mediada por mecanismos tanto necróticos, como no necróticos (apoptóticos)<sup>5</sup>. La acumulación de esta droga en la corteza renal puede alcanzar concentraciones que exceden los niveles séricos hasta unas siete veces, siendo precisamente esta acumulación tisular la base de la toxicidad tubular proximal de la droga<sup>3</sup>. Sin embargo, se ha descrito una disociación entre dicha acumulación tisular y la preservación de la función renal<sup>4</sup>.

Los aminoglucósidos pueden también alterar los mecanismos de concentración urinaria, así como la respuesta de los túbulos colectores a la vasopresina<sup>3</sup>. Lo antes mencionado explica claramente la poliuria acuosa (hipoosmolar) documentada en esta paciente.

El punto central en este caso clínico es la presencia de una insuficiencia renal aguda con urea plasmática normal, no explicable por reducción de la masa muscular, ya que la paciente no era desnutrida, anciana, ni de pequeña contextura corporal.

Bajo condiciones fisiológicas normales, alrededor del 50% de la urea filtrada es reabsorbida en los túbulos contorneados proximales. Parte de la urea restante debe ser reabsorbida en la nefrona cortical distal. Dado el alto flujo sanguíneo cortical y la organización vascular y tubular de esta área, parece poco probable que la urea ya reabsorbida sea restituida a la luz tubular. Al menos 50% de la urea filtrada no puede ser excretada, por lo cual una excreción fraccional de urea (EFU) mayor del 50% podría significar la presencia de un defecto en la reabsorción de urea o su secreción. Como la principal reabsorción de urea se lleva a cabo en el túbulo proximal, zona preponderantemente afectada por la amikacina, una reducción en la reabsorción proximal de urea podría explicar en parte la elevada EFU documentada en esta paciente<sup>6, 7, 8</sup>. La coexistencia de una elevada excreción fraccional de sodio y potasio refuerza la hipótesis de un mecanismo defectuoso de reabsorción tubular en este caso.

Además, dado que el incremento en el flujo urinario es otra causa de aumento en la excreción de urea por disminución de su reabsorción distal, la diuresis acuosa de esta paciente producto de la diabetes insípida nefrogénica inducida por amikacina, puede también explicar su elevada EFU<sup>6</sup>.

Con respecto a la creatininemia esta no sólo estaría elevada como consecuencia de su menor filtración (insuficiencia renal), sino además por reducción de su secreción producto de la disfunción tubular proximal secundaria a amikacina.

## CONCLUSIÓN

La insuficiencia renal aguda con uremia normal, en paciente joven y no desnutrido, podría ser un marcador de disfunción tubular proximal con diabetes insípida.

## REFERENCIAS:

- 1.- Chambers H. The aminoglycosides. In Goodman Gilman A, Limbird LE, Hardman JG (Eds).

The pharmacological basis of therapeutic. New York. Medical Publishing Division. 2002: 1229

2.- Lacy C, Armstrong L, Goldman M, Lance L. Drug information handbook Hudson. Lexi-Comp; 2003: 1115-1116.

3.- Ahijado FJ, Garcia S. Nephrotoxic Acute Renal Failure. In Liaño F, Pascual J. (Eds). "Acute renal failure". Barcelona. Masson.2000: 139-170.

4.- Swan S, Bennett W. Nephrotoxic acute renal failure. In Lazarus JM, Brenner BM (Eds).Acute renal failure. New York. Curchill Livingstone. 1993: 361-4.

5.- El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Taper H, Cumps J, Tulkens. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low dosis of aminoglycosides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2000; 44: 665-675.

6.- Bankir L, Tinh-Trang-Tan MM. Urea and the kidney. Philadelphia. W. B. Saunders Company. 2000: 637-652.

7.- Kokko J. Overview of renal physiology. In Kokko J, Tannen R (eds). Fluids and electrolytes. Philadelphia. W.B Saunders Company. 1996: 855-856

8.- Kaplan A, Kohn O. Fractional excretion of urea as a guide to renal dysfunction. Am J Nephrol 1992; 12: 49-54

---

**Comentario del Dr Omar Abboud. Consultant Nephrologist. Hamad Medical Corporation, Doha, Qatar.**

Sobre todo, se trata de un artículo bien presentado. El mecanismo propuesto para explicar la urea normal en el curso de una creatinina elevada en el suero del paciente con fallo renal agudo es lógico, y razonablemente apoyado por la evidencia dada. Hay algunos comentarios, que deben ser tomados en consideración:

Dos mecanismos potenciales fueron propuestos para el fallo renal aguda: una infección y antibióticos nefrotóxicos. Se asumió que las drogas fueron la causa del fallo renal, ya que comenzaron después de la iniciación de la terapia y se resolvió después de la discontinuación de las drogas. Aunque convengo con esta asunción, la infección habría podido ser la causa: conducir a un fallo renal que se resolvió con el bloqueo de la infección por los antibióticos. La posibilidad de factores múltiples tampoco puede ser eliminada.

Los factores que producían baja urea fueron referidos mencionando que el paciente no tenía ninguna enfermedad del hígado, dieta baja en proteínas o desnutrición, pero el factor que conducía a la creatinina desproporcionadamente alta en la relación la urea no fue atribuido a algo, por ejemplo, excesivo daño muscular producido por el absceso.

---

**Comentario del Dr Jesús Garrido. Unidade de Nefrologia e Diálise. Hospital São Teotónio de Viseu. Viseu. Portugal**

Musso et el al. describen un caso interesante, en el cual la nefrotoxicidad de la droga, especialmente amikacina, cursa con un fallo renal agudo con nivel de urea plasmática normal.

Los Aminoglucósidos son el prototipo de drogas que tienen como efecto secundario importante la

**nefrotoxicidad. El número de pacientes que desarrollan nefrotoxicidad aumenta con el duración de la terapia, y el 50% que alcanza con 14 días o más del tratamiento. Clásicamente, se presenta como necrosis tubular aguda, generalmente no-oliurica. Otras características incluyen: disfunción tubular proximal, enzimuria, proteinuria, glucosuria, hipokalemia, hipomagnesemia... La recuperación es lenta y requiere de 4-6 semanas.**

**A pesar de su potencial nefrotóxico, los antibióticos aminoglucósidos todavía son considerados agentes importantes contra infecciones que comprometen la vida. La meta de identificar y de reducir esta toxicidad ha promovido mucho esfuerzo durante los últimos años. Una observación atenta y cuidadosa de la función tubular proximal, para descubrir la lesión renal en estadio precoz podría evitar las peores consecuencias. Un marcador rápido de la disfunción tubular en esta patología es la actividad urinaria del N-acetilo-B-D-glucosaminidase (NAG), que aumenta en caso de daño tubular proximal. Se ha descrito varios agentes de mejora de la nefrotoxicidad, con más o menos eficacia, como: betabloqueantes, vitaminas, antioxidantes (un compuesto derivados ajo S-allylmercaptocisteína, trans-resveratrol...), drogas antiplaquetarias (trapidil), melatonina...**

**La nefrotoxicidad de estas drogas es frecuente pero este caso es inusual. El interés de este caso es la posibilidad de conseguir un marcador tubular más próximo del daño tubular para identificar cuanto antes la toxicidad renal.**

---

**Recibido: 18 de Junio de 2004.  
Recibido revisado: 28 de Julio de 2004  
Publicado: July 31, 2004**



## UTILIDAD CLÍNICA DE LA VIDEOCONFERENCIA EN TELEMEDICINA

Coma del Corral MJ, Diez Sánchez V, Hernandez Martín A, Gutierrez Ortega MC, Ramírez Herrera M.

Unidad de Investigación y Dermatología. Hospital General Yagüe. Burgos. España

[mjcoma@uninet.edu](mailto:mjcoma@uninet.edu)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2004;2:74-78.

---

[Comentario del revisor Ramón Díaz-Alersi MD.](#) Hospital Puerto Real. Cádiz. España

[Comentario del revisor Horacio J. Peña BS.](#) Profesor de la Universidad Palermo. Buenos Aires. R. Argentina

---

La American Telemedicine Association (ATA) [define la Telemedicina](#) como: "El uso de información médica intercambiada de un sitio a otro mediante comunicación electrónica para la salud y educación del paciente o del proveedor de cuidados, con la finalidad de mejorar el cuidado del paciente". Como puede verse, no se acota cómo, cuando y qué se hace con la información transmitida. Los sistemas de provisión de cuidados a distancia están en continuo desarrollo, y probablemente la definición deberá ser ampliada en el futuro. Las diversas modalidades de teleconsulta por videoconferencia continúan siendo, en la actualidad, el aspecto más relevante de la Telemedicina.

La National Library, dispone de una base de datos llamada Telemedicine Information Exchange (TIE), que se encuentra *online* (<http://tie.telemed.org/>), de libre acceso en Internet. TIE proporciona una plataforma de registro, libre y sin sesgos, de información en Telemedicina y Telesalud. Fué creada y es mantenida por el [Telemedicine Research Center](#). Se financia, bajo contrato, con los fondos federales de USA, de la [National Library of Medicine](#) y del [National Institutes of Health](#). La inclusión de artículos en dicha base de datos no significa necesariamente respaldo de estas entidades gubernamentales.

Las aplicaciones de Telemedicina mediante videoconferencia son muy variadas y, con frecuencia, han sido desarrolladas con la intención de acercar los recursos de salud a los mas alejados de ellos. Las actividades docentes y de investigación son también numerosas, pero no son objeto de esta revisión. TIE contiene un total de 217 programas de Telemedicina y servicios de salud de todo el mundo. De estos, utilizan vídeo interactivo 166 de los que 82 refieren ser objeto de evaluación respecto de la efectividad clínica. Hay además otra larga serie de programas recientemente añadidos y aun no clasificados de los cuales 96 están basados en videoconferencia. Hemos visitado la base de datos TIE, para conocer qué programas de Telemedicina basados en videoconferencia, son o han sido evaluados respecto de su eficacia clínica, tratando de obtener una visión panorámica



actualizada del valor que muestra en Internet la teleconsulta mediante videoconferencia interactiva.

Son muchos los países, centros y entidades que están desarrollando programas y servicios sanitarios mediante Telemedicina, que abarcan desde sencillas aplicaciones que transmiten a través de redes telefónicas, tales como actividades de [Radiología en la Amazonia y el Caribe de Colombia](#), [Dermatología en Waikato, Nueva Zelanda](#), [Oftalmología en Mendoza, Argentina](#), o [urgencias médicas en Costa Rica](#), hasta complejas aplicaciones y extensos desarrollos de potentes entidades, que transmiten mediante infraestructuras informáticas de gran capacidad, ya sea en redes dedicadas de banda ancha, o conexiones satelitales como ocurre, por ejemplo, en la [red NORTH de Canada](#)<sup>1</sup> o entre los privilegiados centros conectados a Internet II<sup>2</sup>, capaces de [multi-videoconferencia sincrónica sobre IP](#), principalmente en Norteamérica y Europa. Además son frecuentes las actividades internacionales, e incluso programas cooperativos entre países tradicionalmente distanciados, como las interconsultas del [Medical College of Georgia, en USA, con otro centro en Sarov, Rusia](#).

### Evaluaciones

Los estudios de evaluación realizados sobre eficiencia clínica no son numerosos. Roine y col. (2001)<sup>3</sup>, realizaron una [revisión sistemática de la literatura sobre Telemedicina](#), publicada entre 1966 y 2000, dirigida a la evaluación de los costes. Encontraron que, de 1124 estudios, la mayoría eran proyectos piloto o estudios de corto periodo de tiempo y solo una minoría tenían suficiente calidad. La evidencia con respecto a la eficacia o rentabilidad de la Telemedicina era limitada, y solo constataron efectividad relativamente convincente en Radiología, Neurocirugía, Psiquiatría, Ecocardiografía, y también probada utilidad de la videoconferencia entre facultativos de Atención Primaria y Especializada, por lo que según la evidencia científica disponible hasta entonces, solamente algunos usos de la Telemedicina son recomendables para un uso generalizado.

Que pacientes se benefician más de la teleconsulta ?

El [Center for Health Sciences Communication's de la East Carolina University](#) ha realizado desde 1992 hasta la actualidad 7.000 teleconsultas de 35 especialidades médicas diferentes. El [estudio demográfico](#) de Gustle y col. (2000)<sup>4</sup>, recogió los datos de 495 de los 1643 pacientes que acudieron a 8 consultorios remotos para teleconsultas médicas mediante videoconferencia interactiva en tiempo real y que, en el año 1999 contestaron una encuesta. Estos datos demográficos se compararon con los de 14.877 pacientes que acudieron en el mismo periodo de tiempo a consultas tradicionales presenciales. Los resultados mostraron que la teleconsulta tuvo más pacientes menores de 10 años (19.6% en teleconsulta, 11.3% consulta tradicional) y mayores de 59 años (26.0% versus 21.5%). Más pacientes de las teleconsultas procedían de minorías étnicas (afroamericanos o hispanos 56.4% vs 34.7%), y la proporción de parados era más alta en pacientes de teleconsultas (12.5% vs 6.5%). El 38% de los pacientes de teleconsulta disponía de renta en niveles de pobreza según los estándares americanos, en contraste con el 14.1% existente en la región (esta información no se recogió en pacientes tradicionales). Las especialidades más solicitadas fueron Dermatología (33,5%), Alergia (21,0%) y Cardiología (17,8%)

Lusignan y col (2001)<sup>5</sup>, en un [estudio caso-control de pacientes con insuficiencia cardiaca](#), vieron que los que fueron telemonitorizados cumplieron mejor las prescripciones, pero no encontraron diferencias respecto a la calidad de vida y a la patología entre los casos y los controles. La videoconsulta comenzó con entusiasmo, pero no demostró su utilidad.

Karp et al., (2000)<sup>6</sup> del Medical College of Georgia, comprobaron que [las teleconsultas con vídeo interactivo son un medio aceptable en Pediatría](#) para la asistencia de niños que viven en áreas rurales, distantes de los centros de referencia, además de constatar beneficios en costes, tiempo y desplazamiento de los pacientes y familiares.

Walkovich (2004)<sup>7</sup>, de la Universidad de Pensilvania, estudió la [utilidad de la teleasistencia](#) en materia de "seguridad en el hogar" utilizando sistemas de videoconferencia portátiles y comparándola con la asistencia tradicional. Este autor constató que no había diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de asistencia.

**NORTH** es la red del norte de Ontario, en Canadá, puesta en servicio en 1998, que ha facilitado desde entonces y hasta el año 2003 un total de 1700 teleconsultas de mas de 30 especialidades diferentes. En su [memoria de 2003](#), refiere que las teleconsultas mas numerosas fueron sobre Dermatología, Psiquiatría, Pediatría, trastornos del movimiento y dolor crónico. El [programa de Telemedicina del Hospital for Sick Children](#), que mas adelante entró a formar parte de dicha red, había realizado 1433 [teleconsultas de Pediatría o Cirugía Pediátrica](#) entre febrero de 1996, y diciembre de 2002. El mayor número de teleconsultas corresponde a la consulta del postoperatorio o de seguimiento de los enfermos.

El National Laboratory for Rural Telemedicine, de la Universidad de Iowa, USA, realiza [teleconsultas de ecocardiografía infantil](#), entre otras varias. Un ensayo clínico sobre los niños atendidos, mostro la ausencia de diferencias significativas entre la consulta presencial y la de teleconsulta utilizando videoconferencia. Por otro lado, también demostraron que las teleconsultas mediante videoconferencia desde cárceles y prisiones, resultan ser un valioso medio para facilitar la asistencia a los reclusos, y se utilizaron principalmente para Psiquiatría y Dermatología.

#### Desencanto?

El National Laboratory for Rural Telemedicine, de la Universidad de Iowa, estudió la validez del [tratamiento de la isquemia cerebral aguda](#), mediante teleconsulta entre el centro de referencia y los médicos de Atención Primaria de centros remotos. El procedimiento incluía videoconferencia con especialistas neurologos, radiologos, etc., y demostró ser eficaz. Sin embargo, al finalizar el estudio dejó de ser utilizado por los médicos locales, que previamente habian comprobado su utilidad. El teléfono continuó siendo el mas frecuente mecanismo de comunicación entre los facultativos. Entre los motivos del abandono, se barajaron el incremento de conocimiento en los medicos y la instauración de protocolos en hospitales locales, y también que los medicos no incorporaban la Telemedicina en su trabajo diario por ser de uso infrecuente. Además, no había incentivos económicos.

De la misma manera, las [teleconsultas de Dermatología](#) en Waikato (Nueva Zelanda), han demostrado la exactitud de diagnóstico, la satisfacción del usuario y la rentabilidad económica, en ensayos clínicos que implicaban a cerca de 500 pacientes. Sin embargo, en opinión de los Dermatólogos, al cabo de 6 años de uso los equipos de videoconferencia estan infrautilizados. Con intención de incrementar el acceso al sistema de teleconsultas se desarrolló una aplicación para transmisión de imágenes estáticas, tomadas con cámaras fotográficas digitales por médicos no especialistas, pero no se incrementó el número de pacientes para Teledermatología, a pesar de que la lista de espera de Dermatología en esa región, para las consultas tradicionales, es de seis meses. Las explicaciones hablan de la falta de incentivos para la utilización de la Telemedicina, la sobrecarga asistencial de los médicos de Atención Primaria, la inercia administrativa, la dificultad de conseguir una cámara fotográfica digital, la falta de acceso del Internet en la consulta y la carencia de reembolso de los gastos.

Wootton y col. (2000)<sup>8</sup>, compararon la teleconsulta con la consulta tradicional de Dermatología mediante un ensayo clínico aleatorizado, sin encontrar diferencias importantes en los resultados clínicos, pero tambien, sin ventajas en los costes. Se deduce, por tanto, que la Teledermatología en tiempo real es clinicamente factible, pero si bien no demuestra mejor [costo-efectividad](#) que la consulta tradicional en el estudio reseñado, un abaratamiento de los costes tecnológicos y el incremento de la distancia entre los centros de referencia y remotos, que modificaría la base del cálculo de costes, hacen que la Teledermatología sea una buena alternativa también en términos económicos. Otro [estudio de costes](#), sobre 1874 teleconsultas en la Universidad de Iowa, puso de manifiesto que estos se van reduciendo a medida que aumenta el número de teleconsultas. Son numerosos los estudios sobre satisfacción, por ejemplo, en pacientes alojados en centros de larga estancia, se confirmó la [satisfacción de los pacientes, enfermeras y médicos](#) por este tipo de consulta<sup>9</sup>. Por otro lado, Jacklin y col. (2003)<sup>10</sup>, establecieron que [unas especialidades son mas propicias que otras](#) y unos procesos mas apropiados que otros para beneficiarse de la teleconsulta. Por otro lado, es sabido que la Telemedicina es onerosa en términos de tiempo empleado por el médico en comparación con la consulta tradicional, si bien hay que considerar también el tiempo y molestias que ahorra el paciente.

Esta panorámica nos lleva a pensar que la Telemedicina puede ser una buena respuesta en materia de provisión de servicios sanitarios. Sin embargo, parece que todavía no tenemos una formulación clara y precisa de la pregunta.

#### BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Gagliardi A, Smith A, Goel V, DePetrillo D. [Feasibility study of multidisciplinary oncology rounds by videoconference for surgeons in remote locales](#). BMC Med Inform Decis Mak. 2003 Jun 19;3(1):7.
- 2.- Locatis C, Fontelo P, Sneiderman C, Ackerman M, Uijtdehaage S, Candler C, Stensaas S, Dennis S. [Webcasting videoconferences over IP: a synchronous communication experiment](#). J Am Med Inform Assoc. 2003 Mar-Apr;10(2):150-3.
- 3.- Roine R, Ohinmaa A, Hailey D. [Assessing telemedicine: a systematic review of the literature](#). Can. Med. Assoc. J., September 1, 2001; 165(6): 765 - 771.
- 4.- Gustke S, Balch DC, Rogers LO, West VL. [Profile of Users of Real-Time Interactive Teleconference Clinical Consultations](#). Arch Fam Med. 2000;9:1036-1040.
- 5.- de Lusignan S, Wells S, Johnson P, Meredith K, Leatham E. [Compliance and effectiveness of 1 year's home telemonitoring. The report of a pilot study of patients with chronic heart failure](#). Eur J Heart Fail. 2001 Dec;3(6):723-30
- 6.- Karp WB, Grigsby RK, McSwiggan-Hardin M, et al. [Use of telemedicine for children with special health care needs](#). Pediatrics. 2000;105 :843 -847
- 7.- Walkovich DE. [Therapists' Perceptions of Home Assessment Techniques: On-Site Versus Virtual Assessment](#). Home Health Care Technology Report (HHCT), March/April 2004, Volume 1, Number 3.
- 8.- Wootton R, Bloomer SE, Corbett R, Eedy DJ, Hicks N, Lotery HE, Mathews C, Paisley J, Steele K, Loane MA. [Multicentre randomised control trial comparing real time teledermatology with conventional outpatient dermatological care: societal cost-benefit analysis](#). BMJ 2000;320:1252-1256
- 9.- Wakefield BJ, Buresh KA, Flanagan JR, Kienzle MG. [Interactive Video Specialty Consultations in Long-Term Care](#). J Am Geriatr Soc. 2004 May;52(5):789-93.
- 10.- Jacklin PB, Roberts JA, Wallace P, Haines A, Harrison R, Barber JA, Thompson SG, Lewis L, Currell R, Parker S, Wainwright P. [Virtual outreach: economic evaluation of joint teleconsultations for patients referred by their general practitioner for a specialist opinion](#). BMJ, July 10, 2003; 327(7406): 84.

Agradecimientos: Trabajo realizado con ayuda del Fondo de Investigación Sanitaria, PI021669

---

Comentario del revisor Ramón Díaz-Alersi MD. Hospital Puerto Real. Cádiz. España.

El artículo de Coma y col. sobre Telemedicina es una excelente revisión sobre su implantación mundial, sus ventajas y los problemas fundamentales que sufre actualmente. Todos los estudios citados muestran, si no su superioridad sobre la consulta tradicional, si la no inferioridad. Es útil, no sólo en especialidades con alta dependencia de técnicas de imagen sino también en otras en las que

**la comunicación con el paciente y la exploración física son primordiales, como la Medicina Interna o la Psiquiatría. Y son los sectores más desfavorecidos de la población los que pueden ser mas beneficiados, algo que debería ser tenido en cuenta.**

**Sin mebargo, resulta hasta cierto punto descorazonador constatar como las ventajas de la Telemedicina no son aprovechadas al máximo, incluso en aquellos sitios que disponen de los medios necesarios, probablemente porque aún falta una cultura de uso de estos recursos, que afecta más a los profesionales sanitarios que a los pacientes.**

---

**Comentario del revisor Horacio J. Peña. Profesor de la Universidad Palermo. Buenos Aires. R. Argentina.**

**El trabajo de los investigadores del Hospital General Yagüe es un completo reconocimiento de los estudios realizados a nivel mundial acerca de la validez de la videoconferencia en sus aplicaciones clínicas. Se desprende del artículo el alto potencial de la videoconferencia en estos ámbitos, sobre todo en zonas complicadas para las técnicas clínicas tradicionales (donde por razones económicas es imposible contar con personal médico especializado)**

**Debe asimismo hacerse hincapié en la necesidad de capacitar y crear costumbre en la utilización de estas tecnologías en los profesionales, como paso fundamental para permitir el desarrollo de este potencial.**

---