

## Análisis de la especificidad de la definición de caso en el diagnóstico clínico de la gripe

La autotoma es tan efectiva como las muestras obtenidas por el ginecólogo para la detección del HPV

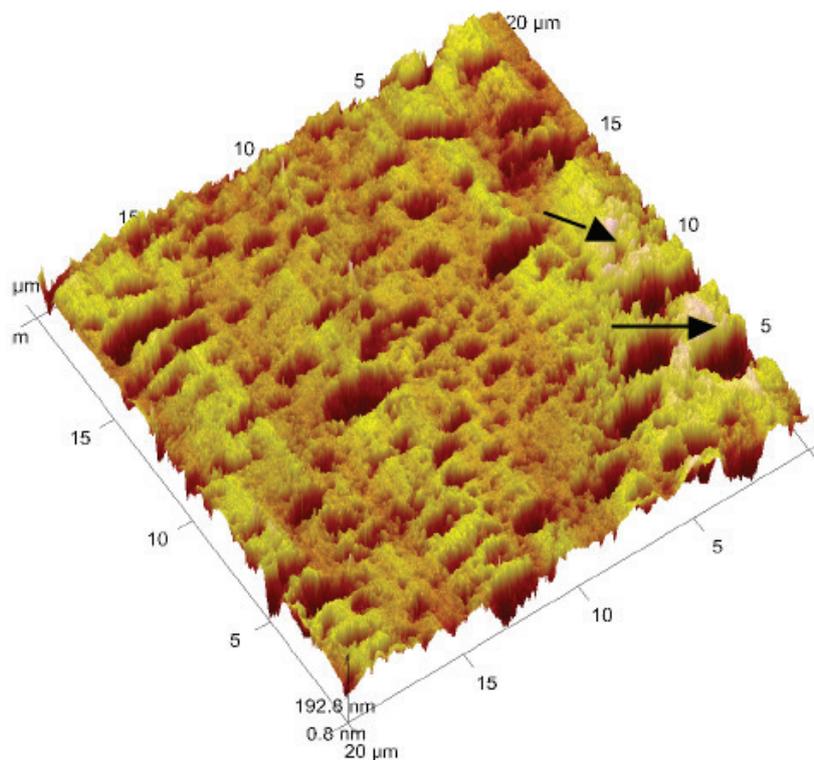
Effects of prenatal and postnatal exposure to chlordimeform on serotonin levels in brain regions of adult's male and female rats

Impacto de la disfunción ventricular izquierda en el paciente intervenido de estenosis valvular aórtica moderada-grave

Cambios de la severidad de la regurgitación aórtica durante el esfuerzo. ¿Disminuye la insuficiencia aórtica con el ejercicio?

Pathological mineralization of calcium phosphate

Caso clinicopatológico: varón joven con disminución del nivel de conciencia y consumo reciente de cocaína



**Medicina Balear**, òrgan de la Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears, va aparèixer el 1986 amb l'objectiu de donar curs a les inquietuds científiques i fomentar l'esperit d'investigació dels professionals de la sanitat balear i amb la pretensió suplementària de projectar en la societat temes d'interès sanitari.

**Medicina Balear** publica en català, castellà o anglès treballs originals, articles de revisió, cartes al director i altres escrits d'interès relacionats amb les ciències de la salut i presta particular atenció als treballs que tinguin per àmbit les Illes Balears i altres territoris de la conca mediterrània occidental. La revista sotmet els originals a la revisió anònima per al menys dos experts externs (peer review).



El material científic publicat a **Medicina Balear** resta protegit per drets d'autor. **Medicina Balear** no és responsable de la informació i opinions dels autors.

Aquesta obra -llevat que s'indiqui el contrari en el text, en les fotografies o en altres il·lustracions- és subjecta a la llicència de Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 Espanya de Creative Commons; <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/>. Així, doncs, s'autoritza al públic en general a reproduir, distribuir i comunicar l'obra sempre que se'n reconegui l'autoria i l'entitat que la publica i no se'n faci un ús comercial ni cap obra derivada.

**Medicina Balear** es troba incorporada a la Biblioteca Digital de les Illes Balears, de la Universitat de les Illes Balears, i està inclosa en les bases de dades següents: Latindex (catàleg), Dialnet, Índice Médico Español, DOAJ, Imbiomed



IME  
Índice  
Médico  
Español

Dialnet

latindex

DOAJ  
DIRECTORY OF  
OPEN ACCESS  
JOURNALS



## EDITA

Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears



[www.ramib.org](http://www.ramib.org)

Campaner, 4, baixos. 07003 Palma de Mallorca Tel. 971 72 12 30 Email: [info@ramib.org](mailto:info@ramib.org)  
Pàgina web: <http://www.ramib.org>

Dipòsit Legal: PM 486 - 95

eISSN: 2255 - 0569

## Disseny i maquetació

Intelagencia Publicitat - [www.intelagencia.es](http://www.intelagencia.es) - [intelagencia@intelagencia.es](mailto:intelagencia@intelagencia.es)

# MEDICINA · BALEAR

Publicació quadrimestral de ciències de la salut de la Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears

**Director** Macià Tomàs Salvà,  
Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears (RAMIB)

## CONSELL EDITORIAL

<b>Subdirector</b>	A. Arturo López González, <i>RAMIB</i>
<b>Secretari de la publicació</b>	Joan March Noguera, <i>RAMIB</i>
<b>Editor científic</b>	Marta Couce Matovelle, <i>Case Western Reserve University</i>
<b>Assessors editorials</b>	José A. Guijarro Pastor, <i>AEMET</i> · Jaume Rosselló Mir, <i>UIB</i>
<b>Redactor en cap</b>	J. L. Olea Vallejo, <i>RAMIB</i>
<b>Vocals</b>	Antoni Aguiló Pons, <i>Universitat de les Illes Balears</i> · Bartolomé Burguera González, <i>Cleveland Clinic (Ohio)</i> · Amador Calafat Far, <i>Socidrogalcohol</i> · Carlos Campillo Artero, <i>Universitat Pompeu Fabra</i> · Valentín Esteban Buedo, <i>Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana</i> · Carmen González Bosch, <i>Universitat de València</i> · Miguel A. Limon Pons, <i>Institut Menorquí d'Estudis</i> · Virgili Páez Cervi, <i>Bibliosalut</i> · Lucio Pallarés Ferreres, <i>Hospital Son Espases, Ibsalut</i> · Ignacio Ricci Cabello, <i>University of Oxford</i> · Guillermo Sáez Tormo, <i>Universitat de València</i> · M <sup>a</sup> Teófila Vicente Herrero, <i>IUNICS</i>

## CONSELL CIÈNTIFIC

M<sup>a</sup> José Anadón Baselga (*Universidad Complutense de Madrid*), Miquel Capó Martí (*Universidad Complutense de Madrid*), Antonio Coca Payeras (*Universitat de Barcelona*), James Drane (*Edinboro University*), Leopoldo Forner Navarro (*Universitat de València*), Alexandre García-Mas, (*Universitat de les Illes Balears*), Antoni Gelabert Mas (*Universitat Autònoma de Barcelona*), Joan Grimalt Obrador (*Consell Superior d'Investigacions Científiques, CSIC*), Federico Hawkins Carranza (*Universidad Complutense de Madrid*), Joan Carles March Cerdà (*Escuela Andaluza de Salud Pública, EASP*), Gabriel Martí Amengual (*Universitat de Barcelona*), Jasone Monasterio Aspiri (*Universitat Autònoma de Barcelona*) Rosa Pulgar Encinas (*Universidad de Granada*), Ciril Rozman (*Universitat de Barcelona*).

## Amb la col·laboració de



[www.medicinabaleaar.org](http://www.medicinabaleaar.org)



# PREMIOS, BECAS Y AYUDAS

## PREMIOS DE INVESTIGACIÓN 2015

La **Fundació Patronat Científic** convoca los **Premios de Investigación Mateu Orfila, Damià Carbó y Metge Matas** con la finalidad de premiar la **trayectoria de la investigación en Ciencias de la Salud** en nuestra comunidad.

Más info en:



## PREMIO MUTUAL MÉDICA AL MEJOR PROYECTO DE TESIS DOCTORAL

El premio tiene como finalidad **facilitar a los médicos colegiados** en Illes Balears la **obtención del título de Doctor**. Con el patrocinio de **Mutual Médica**.

Más info en:



## BECAS BANC SABADELL DE ROTACIÓN EXTERNA PARA MÉDICOS RESIDENTES

Facilitar a los médicos que realicen la residencia en hospitales de Balears la **formación**, al menos durante un mes, en **centros hospitalarios nacionales y extranjeros**, en el último año de la residencia o al terminar la misma.

Más info en:



## BECAS DE INNOVACIÓN PARA MÉDICOS COLEGIADOS, EXCEPTO MIR

Tienen como objetivo facilitar a los médicos colegiados en les Illes Balears, excepto MIR, la **formación**, **durante al menos un mes**, en **centros sanitarios nacionales y extranjeros en técnicas diagnósticas o terapéuticas**.

Más info en:



## AYUDAS PARA PUBLICACIONES MÉDICAS EN INGLÉS

Proporcionar ayuda a los médicos colegiados en Illes Balears la **publicación de artículos científicos** en revistas editadas **en lengua inglesa**.

Más info en:



# MEDICINA • BALEAR

PUBLICACIÓ DE LA REIAL ACADÈMIA DE MEDICINA DE LES ILLES BALEARS

www.medicinabaleaer.org

## SUMARI

### EDITORIAL

- La epidemia de Ébola ¿Una crisis resuelta?** ..... 8-11  
Antonio Fe Marqués

### ORIGINALS

- Análisis de la especificidad de la definición de caso en el diagnóstico clínico de la gripe** ..... 12-15

Jordi Reina, Rosa Rubio, Antonio Íñigo, Jaume Giménez  
y Red Centinela de Vigilancia de la Gripe (RCVG) de Baleares

- La autotoma es tan efectiva como las muestras obtenidas por el ginecólogo para la detección del HPV** ..... 16-20

Hèlia Mariño, Enrique Serra, Antonio Gutiérrez

- Effects of prenatal and postnatal exposure to chlordimeform on serotonin levels in brain regions of adult's male and female rats** ..... 21-26

José Manuel García, Pilar Alias, María Teresa Frejo, María José Anadón,  
Miguel Andrés Capó y Javier del Pino

- Impacto de la disfunción ventricular izquierda en el paciente intervenido de estenosis valvular aórtica moderada-grave** ..... 27-33

María Araceli Molina Povedano, María Riera Sagrera, Rocío Amézaga Menéndez, Miguel Fiol Sala,  
María Asunción Colomar Ferrà, Miguel Ángel Rodríguez Yago, Juan Pedro Martín del Rincón

- Cambios de la severidad de la regurgitación aórtica durante el esfuerzo ¿Disminuye la insuficiencia aórtica con el ejercicio?** ..... 35-42

Lucía Pasamar Márquez, José Francisco Forteza Albertí, Antonio Rodríguez Fernández,  
Pere Pericás Ramis, Andrés Carrillo López, Antoni Figuerola Roselló

### ARTICLE ESPECIAL

- Pathological mineralization of calcium phosphate** ..... 43-46  
Félix Grases, Otakar Sohnel

### ESTUDI DE CASOS

- Caso clinicopatológico: varón joven con disminución del nivel de conciencia y consumo reciente de cocaína** ..... 47-51

M<sup>a</sup> Dolores Moragues Benito, Bartomeu Colom Oliver, Mireia Illueca Moreno,  
Carmen Jiménez Martínez, Marta Couce Matovelle, Manuel del Río Vizoso

### LLIBRE

- Procesos tóxicos ambientales de los metales pesados y metaloides en poblaciones humanas** ..... 52

de Miguel Capó Martí, José María Delgado Mateo, María José Anadón Baselga,  
María Teresa Frejo Moya, María del Carmen Sandoval Bartolomé

Ricardo Andrés Roa-Castellanos

# Seguro de Automóvil



## Porque cuando se queda sin coche, es cuando más ayuda necesita



Hasta un

**50%**  
BONIFICACIÓN

### Así funcionan nuestras nuevas coberturas exclusivas:

¿Tiene un problema con el coche y necesita que alguien le acerque al taller?

**Nosotros lo hacemos**

¿No sabe cómo volver a casa después?

**Nosotros le llevamos**

Y en caso de siniestro total, ¿cómo va a moverse?

**Con el coche de sustitución que A.M.A. pondrá a su disposición**

**Así de fácil y así de claro.**

Confíe en la experiencia de A.M.A. y disfrute del mejor servicio con total tranquilidad.

**A.M.A. PALMA DE MALLORCA** Barón de Pinopar, 10 Tel. 971 71 49 82 [pmallorca@amaseguros.com](mailto:pmallorca@amaseguros.com)



LA CONFIANZA ES MUTUAL  
[www.amaseguros.com](http://www.amaseguros.com) **902 30 30 10**



# MEDICINA • BALEAR

SCIENTIFIC JOURNAL OF THE ROYAL ACADEMY OF MEDICINE OF THE BALEARIC ISLANDS

www.medicinabaleaer.org

## CONTENTS

### EDITORIAL

- The Ebola virus epidemic, a solved threat?** \_\_\_\_\_ 8-11  
Antonio Fe Marqués

### ORIGINAL ARTICLES

- Specificity analysis of the case definition in clinical diagnosis of influenza** \_\_\_\_\_ 12-15  
Jordi Reina, Rosa Rubio, Antonio Íñigo, Jaume Giménez  
and Red Centinela de Vigilancia de la Gripe (RCVG) de Baleares
- Self-sampling is as much effective as Gynecologist samples for HPV detection** \_\_\_\_\_ 16-20  
Helia Mariño, Enrique Serra, Antonio Gutiérrez
- Effects of prenatal and postnatal exposure to chlordimeform on serotonin levels in brain regions of adult's male and female rats** \_\_\_\_\_ 21-26  
José Manuel García, Pilar Alias, María Teresa Frejo, María José Anadón,  
Miguel Andrés Capó and Javier del Pino
- Impact of left ventricular dysfunction in patients undergoing moderate to severe aortic stenosis** \_\_\_\_\_ 27-33  
María Araceli Molina Povedano, María Riera Sagrera, Rocío Amézaga Menéndez, Miguel Fiol Sala,  
María Asunción Colomar Ferrà, Miguel Ángel Rodríguez Yago, Juan Pedro Martín del Rincón
- Changes to the severity of aortic regurgitation during exertion, does aortic insufficiency decrease with exercise?** \_\_\_\_\_ 35-42  
Lucía Pasamar Márquez, José Francisco Forteza Albertí, Antonio Rodríguez Fernández,  
Pere Pericás Ramis, Andrés Carrillo López, Antoni Figuerola Roselló

### SPECIAL ARTICLES

- Pathological mineralization of calcium phosphate** \_\_\_\_\_ 43-46  
Félix Grases, Otakar Sohnel

### CASE STUDIES

- Clinico-pathologic case: young male with low level of consciousness and recent cocaine abuse** \_\_\_\_\_ 47-51  
M<sup>a</sup> Dolores Moragues Benito, Bartomeu Colom Oliver, Mireia Illueca Moreno,  
Carmen Jiménez Martínez, Marta Couce Matovelle, Manuel del Río Vizoso

### BOOK

- Procesos tóxicos ambientales de los metales pesados y metaloides en poblaciones humanas** \_\_\_\_\_ 52  
of Miguel Capó Martí, José María Delgado Mateo, María José Anadón Baselga,  
María Teresa Frejo Moya, María del Carmen Sandoval Bartolomé  
Ricardo Andrés Roa-Castellanos

## La epidemia de Ébola ¿Una crisis resuelta?

*The Ebola virus epidemic, a solved threat?*

**Antonio Fe Marqués**

*Coronel Médico. Especialista en Medicina Interna. Jefe de la Unidad de Alertas NRBQ-Infecciosas. Hospital Central de la Defensa "Gómez Ulla"*

El primer brote conocido de Enfermedad por Virus Ébola (EVE) tuvo lugar en 1976 en Yambuku, Zaire, actual República Democrática del Congo, con 318 casos y una mortalidad del 88%<sup>1</sup>. Desde entonces hasta comienzos del año 2014, se tiene constancia de hasta 21 brotes en África, con mortalidad elevada pero variable dependiendo de la cepa, siempre en el África Oriental, autolimitados a zonas rurales y afectando a unos cientos de personas en el peor

de los casos. Además hubo contagios aislados, con baja mortalidad, en países occidentales (Reino Unido, Estados Unidos de América, Rusia) y en Filipinas, asociados a la importación de monos infectados y a trabajos de laboratorio<sup>1</sup>. El Ébola no era un problema para Occidente.

Sin embargo, el 22 de marzo de 2014, Guinea Conakry notifica a la Organización Mundial de la Salud (OMS) un brote en su capital. Por primera vez en la historia, el virus ataca en el África occidental, en una población urbana importante, y con aeropuerto internacional. Y por primera vez en la historia, Occidente se pregunta si el Ébola puede ser una amenaza<sup>2</sup>... Las alarmas comienzan a dispararse y el mundo occidental empieza a prepararse frente a la "nueva" enfermedad...

Hasta que el 8 de agosto de 2014, con la enfermedad extendida y sin control (485 enfermos en Guinea Conakry con 358 fallecidos, 646 en Sierra Leona con 273 fallecidos, 468 en Liberia con 255 fallecidos y 4 en Nigeria con 1 fallecido), la OMS realiza una declaración de suma trascendencia<sup>3</sup>:

*"Después de debatir y deliberar sobre la información aportada, el Comité consideró:*

*Que el brote de EVE en África Occidental constituye un 'evento extraordinario' y supone un riesgo de salud pública para otros estados.*



*Que las posibles consecuencias de una mayor propagación internacional son particularmente graves dada la virulencia del virus, su intensa transmisión tanto en la comunidad como en los centros sanitarios, y la debilidad de los sistemas de salud en los países afectados y en los que corren mayor riesgo de verse afectados.*

*Que es esencial una respuesta internacional coordinada para detener y revertir la propagación internacional del virus.*

*Por unanimidad, el Comité consideró que se han cumplido las condiciones para declarar una emergencia de salud pública de importancia internacional.*

*El actual brote de EVE empezó en Guinea en Diciembre de 2013, y en la actualidad hay transmisión en Guinea, Liberia, Nigeria y Sierra Leona. A fecha de 4 de agosto de 2014, los cuatro países habían notificado 1711 casos (1070 confirmados, 436 probables y 205 posibles), 932 de ellos mortales. Se trata del mayor brote de EVE registrado hasta ahora. Para responder a él, varios países no afectados han emitido una serie de consejos o recomendaciones en relación con los viajes".*

Sin embargo, no se adoptan medidas restrictivas en relación con los viajes personales, la importación o exportación, las aduanas, y un largo etcétera. No es objeto de este editorial debatir esta cuestión, sólo señalar que no se hizo.

En lo que concierne a nuestro país, a España, con fecha 6 de agosto, se había ordenado desde Presidencia del Go-

bierno a la Unidad Médica de Aeroevacuación del Ejército del Aire, la repatriación de dos pacientes, un enfermo grave y un caso sospechoso. En un plazo de tres horas, el dispositivo estaba dispuesto para despegar, porque nuestras Fuerzas Armadas se habían preparado para un posible evento de estas características desde el mes de abril, dado que el contingente español desplegado en el extranjero incluía Mali, país limítrofe con Guinea Conakry. La repatriación se realizó satisfactoriamente, si bien el paciente enfermo, a pesar de la extraordinaria labor de los facultativos del Hospital La Paz-Carlos III falleció a los pocos días. El caso sospechoso, no fue tal. Posteriormente, con fecha 21 de septiembre, se realizó una segunda aeroevacuación, igualmente atendida en el Hospital La Paz-Carlos III. Y lamentablemente, el día 6 de octubre, se informa del primer caso de EVE autóctono en un país occidental, en el contexto de la actual epidemia, en una trabajadora del Hospital que ha atendido a los pacientes evacuados<sup>4</sup>. Evidentemente, la alarma social fue mayúscula, porque “teníamos el Ébola en España”. Todos los medios de comunicación se hicieron eco de la noticia sobradamente. Afortunadamente, la paciente fue dada de alta tras una penosa enfermedad, y en fecha 2 de diciembre de 2014 la OMS declaró a España libre de Ébola<sup>5</sup>...

Sin embargo, a fecha 27 de febrero de 2015<sup>5</sup>, la enfermedad persiste en Guinea Conakry, Liberia y Sierra Leona, con un número total de casos acumulados en los tres países con transmisión intensa, que asciende a 23.694 casos y 9.380 fallecidos. La tasa de letalidad entre los pacientes hospitalizados, considerando aquellos para los que hay registro de su desenlace, se encuentra entre el 53% y el 64%. ¿Podemos así afirmar que la crisis ha terminado?

Por otra parte, antes de que todo se resolviera “satisfactoriamente” en nuestro País, y el entrecomillado es obligado, el Gobierno había adoptado otras medidas. Había creado un “Comité de Crisis” específico para el Ébola. Y había decidido dotar al Hospital Central de la Defensa “Gómez Ulla” de una Unidad Hospitalaria de Aislamiento de Alto Nivel. Alguno se preguntará que porqué el Hospital Gómez Ulla. La respuesta la tiene el Gobierno, pero parece razonable pensar que el único Hospital General que no está transferido, es decir que pertenece a la Administración Central, es precisamente ese Hospital. El caso es que con fecha 8 de noviembre, se publica el Real Decreto-ley 14/2014 por el que se conceden créditos extraordinarios para “llevar a cabo la remodelación de la planta 22 del Hospital Central de la Defensa “Gómez Ulla” como unidad de aislamiento hospitalario de alto nivel”.

Este concepto, “Unidad de Aislamiento Hospitalario de Alto Nivel”, puede sonar a “una Unidad excelente”. Pero no es tal.

Hablemos de EUNID. El Proyecto EUNID (European Network of Infectious Diseases) nace en 2004 y lo constituyen 16 países europeos, entre ellos España. Está finan-

ciado por la Unión Europea y sus objetivos son identificar las instalaciones actuales para el manejo clínico de los pacientes con infecciones altamente contagiosas (HID, High Infectious Diseases) y definir las especificaciones para una unidad de aislamiento de alto nivel para estas enfermedades infecciosas en Europa.

Conforme al Grupo de trabajo EUNID<sup>6</sup>, una Unidad de Aislamiento Hospitalario de Alto Nivel (HLIU, High Level Isolation Unit) es *una instalación flexible, diseñada específicamente para optimizar los procedimientos de contención y control de la infección, para uno o un pequeño número de pacientes con sospecha de enfermedades altamente infecciosas probables o conocidas, proporcionando un alto nivel de atención al paciente y apropiado para su condición.*

EUNID define una enfermedad altamente infecciosa como:

- Una infección que es transmisible de persona a persona.
- Que es peligrosa para la vida.
- Que presenta un peligro grave en la atención de la salud, el entorno y la comunidad.
- Que requiere medidas de control específicas.

La lista de Enfermedades que EUNID considera altamente contagiosas incluye:

Fiebres hemorrágicas virales y las infecciones por poxvirus, que se clasifican en el nivel de riesgo 4 y por lo tanto requieren precauciones especiales de aislamiento y de laboratorio.

Otras Infecciones consideradas específicamente:

- Gripe aviar con transmisión interpersonal.
- SARS u otra infección respiratoria emergente y altamente contagiosa
- Influenza pandémica.
- Tuberculosis extremadamente resistente o multirresistente con alto nivel de resistencia.
- Los casos de un patógeno emergente desconocido o sospecha de agentes bioterroristas.

Pero hay muchos otros requisitos de las Unidades de Aislamiento de Alto Nivel:

La Unidad debe estar ubicada junto a un hospital de tercer nivel.

Podría ser un pabellón independiente o, con la ingeniería adecuada y protocolos operacionales, situado dentro de un edificio de varios pisos.

Debe tener capacidades de cuidados críticos: deben ser incluidos en el diseño y las políticas operacionales. Tiene que haber expertos disponibles para el asesoramiento y el apoyo pediátrico.

Debe haber acceso al asesoramiento y el apoyo de otras especialidades.

Una HLIU puede usarse día a día para pacientes no HID, ya que esto aseguraría que la HLIU no se deteriorase entre los períodos de utilización específica. La instalación de HLIU debe estar lista para recibir a un paciente HID en un plazo de tres o cuatro horas (un retraso de más de 6 horas es inaceptable).

Se debe garantizar el tiempo para la formación de personal especializado en los protocolos especiales de la HLID.

Debe incluir sistemas de seguridad para las visitas, control de accesos, sistemas de vigilancia con cámaras, apertura y cierre de puertas automatizado, presión negativa con filtros HEPA y apoyo de un Laboratorio de nivel BSL2 al menos.

Las habitaciones deben disponer de esclusas con un tamaño adecuado para permitir la adecuada puesta y retirada de los Equipos de Protección Personal, en torno a los 6-9 m<sup>2</sup> al menos, y el tamaño de la habitación no puede ser inferior a los 20 m<sup>2</sup> aproximadamente, para permitir el adecuado movimiento del personal y la introducción del Equipamiento necesario. Deben disponer de sistemas de comunicación bidireccional "manos libres", los suelos, paredes y techos deben ser lavables y estar sellados y un largo etcétera de requerimientos específicos (**Figura 1**).

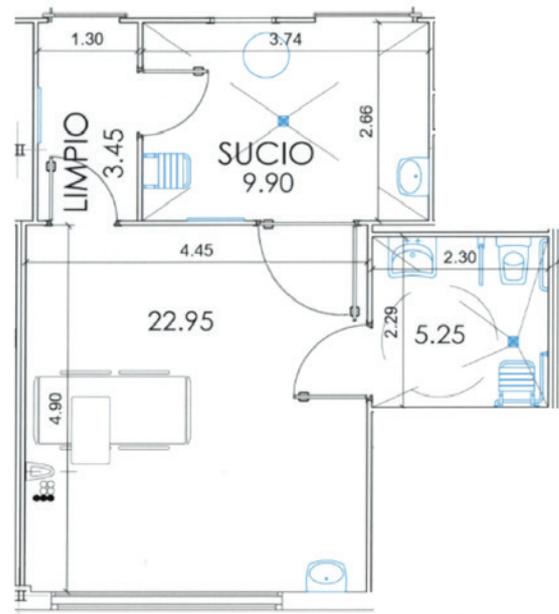


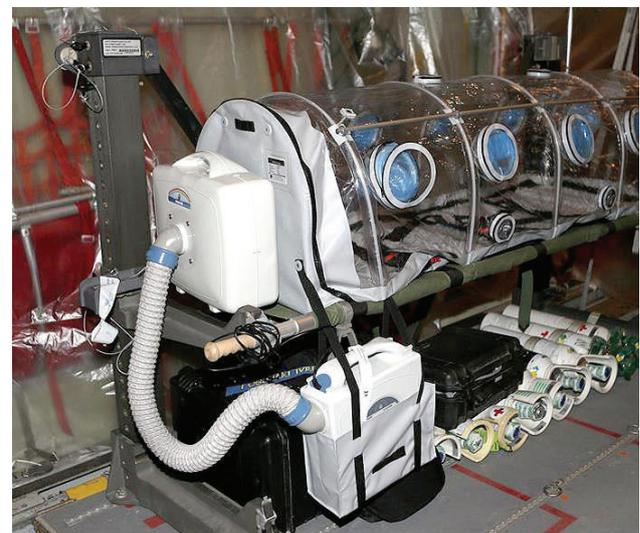
Figura 1: Habitación estándar de una HLIU.

riesgo incrementaría si aparecieran más formas neumónicas de la enfermedad.

En el momento actual, el Hospital "Gómez Ulla" se encuentra en fase de creación de la Unidad, el Consejo Interterritorial de Salud ha designado a siete Centros Sanitarios de otras tantas Comunidades Autónomas (Andalucía, Aragón, Canarias, Cataluña, Madrid, País Vasco y Valencia) para que dispongan de pequeñas unidades que les permita hacer frente a un posible caso de Ébola, España está libre de la enfermedad desde hace meses y los medios de comunicación ya no hablan de la enfermedad. Así pues podemos volver a preguntarnos, ¿la crisis ha terminado? La respuesta sería otra pregunta... ¿Qué crisis? O mejor dicho, ¿a cuál de ellas nos referimos?

Si prestáramos más atención al Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias del Ministerio de Sanidad que a los medios de comunicación, veríamos que hay varias Alertas Internacionales<sup>5</sup>, que no dejan de "estar ahí" porque no se hable de ellas...

En Madagascar se notificó un caso de peste bubónica el 31 de agosto de 2014. Hasta el día de hoy, se han contabilizado 263 enfermos con 71 fallecidos. Sólo un pequeño porcentaje de todos los casos se han presentado en su forma neumónica. Según información de la OMS, la situación podría empeorar debido a los débiles sistemas sanitarios del país y la alta densidad de población en la capital. Se trata de un evento grave para la salud pública ya que esta enfermedad, especialmente su forma neumónica, es una enfermedad contagiosa con alta mortalidad. El riesgo de extensión internacional de esta enfermedad es bajo, ya que la mayoría de los casos se han presentado en su forma bubónica. Sin embargo, se han notificado casos en la capital y el



También es fácil recordar la Gripe Aviar A(H5N1) de 2005. Sigue "viva", aunque con baja intensidad. En el pacífico occidental, en los últimos 10 años, se han producido más de 200 casos con una mortalidad superior al 50%.

Pero hay otra cepa gripal de la que ni se ha hablado en los medios. La Gripe Aviar A(H7N9) aparece en China en abril de 2013. Desde entonces se han notificado 566 casos con 204 fallecidos.

Y acercándonos a la fecha actual, el 5 de mayo de 2014 la Directora General de la OMS ha declarado que la extensión internacional de la transmisión del poliovirus salvaje (PVS) en 2014 es un Evento de Salud Pública de Importancia Internacional (ESPII), basándose en la evaluación realizada por el Comité de Emergencia del Reglamento Sanitario Internacional y en el contexto de la Iniciativa global para la erradicación de la poliomielitis. El Comité concluye que es necesaria una coordinación internacional para frenar esta transmisión.

Por último, incidir en que, aunque con baja letalidad, la extensión fuera de África del Virus Chikungunya es ya imparable. Desde finales de 2013, se han contabilizado 1.244.622 casos en América, con 183 fallecidos. En España se han notificado 243 casos, en principio todos ellos importados, pero no olvidemos que tenemos a uno de los vectores, el mosquito *Aedes albopictus*, especialmente en la zona de levante, por lo que el riesgo de un brote epidémico es una realidad a considerar.

Recientemente, en la prensa se recogían de esta manera unas declaraciones de la Vicepresidenta del Gobierno en relación a los créditos asignados para el Equipamiento de las nuevas instalaciones del Hospital "Gómez Ulla": *Así lo ha anunciado en la rueda de prensa posterior al Consejo la Vicepresidenta del Gobierno, Soraya Sáez de Santamaría, quien ha asegurado que el objetivo de esta subvención es "reforzar, perfeccionar y modernizar" la planta para dotar a la defensa nacional y al Sistema Nacional de Salud (SNS) de medios "muy sanitarios". "No es una instalación que tenga su razón de ser exclusivamente por la crisis del Ébola, pero puede ser de gran utilidad para afrontar cualquier aspecto que pueda producirse en dicha enfermedad", ha comentado Sáez de Santamaría. Dicho esto, la Vicepresidenta ha asegurado que "lo más importante" del acuerdo adoptado por el Gobierno es que forma parte de la obligación que tienen las Fuerzas Armadas de estar preparadas ante "cualquier eventualidad", entre las que caben las enfermedades infecciosas. "Realizan misiones en países del mundo donde se dan varios tipos de enfermedades infecciosas y ahora se están dando los pasos necesarios para proteger y equipar a nuestras Fuerzas Armadas adecuadamente, con el fin de responder a estos riesgos y mejorar las capacidades existentes".*

Efectivamente, la crisis del Ébola puede parecer que está controlada en España, y confiemos en que así sea. Pero en cualquier momento podemos enfrentarnos a otra crisis similar y debemos estar en condiciones de afrontarla con las mayores garantías posibles.

## Bibliografía

- Centers for Diseases Control. Cronología de brotes: enfermedad del virus del Ébola. Disponible en <http://espanol.cdc.gov/enes/vhf/ebola/outbreaks/history/chronology.html> (Visitado el 5 de marzo de 2015)
- Feldmann H. Ebola — A Growing Threat? N Engl J Med June, 1, 2014. DOI: 10.1056/NEJMp1405314
- Declaración de la OMS sobre la reunión del Comité de Emergencias del Reglamento Sanitario Internacional acerca del brote de enfermedad por el virus del Ebola de 2014 en África Occidental de 8 de agosto de 2014. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2014/ebola-20140808/es/> (Visitado el 23 de febrero de 2015)
- Parra JM, Salmeron OJ, Velasco M. The First Case of Ebola Virus Disease Acquired outside Africa. N Engl J Med 2014; 371:2439-2440
- Alertas de Salud Pública del Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Disponible en: [http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1354187044603&language=es&pagename=PortalSalud%2FPage%2FPTSA\\_pintarContenidoFinal&vest=1161769240369](http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1354187044603&language=es&pagename=PortalSalud%2FPage%2FPTSA_pintarContenidoFinal&vest=1161769240369) (Visitado el 2 de marzo de 2015)
- Bannister B, Puro V, Francesco Fusco M, Heptonstall J, Ippolito G, for the EUNID Working Group. Framework for the design and operation of high-level isolation units: consensus of the European Network of Infectious Diseases. Lancet Infect Dis 2009; 9: 45-56

# Análisis de la especificidad de la definición de caso en el diagnóstico clínico de la gripe

*Specificity analysis of the case definition in clinical diagnosis of influenza*

**Jordi Reina<sup>1</sup>, Rosa Rubio<sup>1</sup>, Antonio Iñigo<sup>1</sup>, Jaume Giménez<sup>2</sup>  
y Red Centinela de Vigilancia de la Gripe (RCVG) de Baleares**

1. Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases

2. Servicio de Epidemiología de la CAIB. Palma de Mallorca

## Corresponding author

Jordi Reina

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología.

Hospital Universitario Son Espases

Ctra. Valldemossa km 7,5 - 07122 Palma de Mallorca

E-mail: jorge.reina@ssib.es

Recibido: 12 - I - 2015

Aceptado: 2 - II - 2015

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.30.01.12

## Resumen

**Introducción:** Para el estudio epidemiológico de la gripe se ha establecido la definición de caso sospechoso que debería ser confirmado a través del análisis virológico. El objetivo es estudiar la etiología viral de las muestras de la red centinela y su relación con la definición de caso.

**Pacientes y método:** Se ha realizado un estudio prospectivo en la temporada gripal 2013-2014 sobre la etiología viral de las muestras respiratorias procedentes de la red centinela. La detección del virus se realizó mediante una técnica de amplificación genómica RT-PCR en tiempo real.

**Resultados:** Se han estudiado 153 muestras; correspondiendo 121 (79%) a adultos y 32 (21%) a niños. De ellas, 60 (39.2%) fueron positivas a los virus gripales (49 gripe A(H1N1)pdm09 y 11 gripe A (H3N2)), 55 (35.9%) negativos y en 38 (24.8%) pudo detectarse un virus no gripal. En 98 (64%) muestras se pudo detectar la presencia de algún virus. En las 38 muestras positivas a otros virus, se detectaron 20 (52.6%) rinovirus, 6 (15.7%) coronavirus, 3 (7.8%) adenovirus, 3 (7.8%) parainfluenza tipo 1, 3 (7.8%) virus respiratorio sincitial, 1 (2.6%) bocavirus, 1 (2.6%) metapneumovirus y 1 (2.6%) enterovirus. El número medio global de síntomas que presentaron las 153 muestras fue de 6.25. En las muestras positivas a gripe fue de 6.45, en las negativas de 6.16 y en las positivas a otros virus de 6.07.

**Conclusiones:** La actual definición de caso utilizada por los médicos centinela para la sospecha de gripe presenta una baja especificidad. Sólo la exigencia de presentar 7 síntomas permitiría incrementar esa especificidad.

**Palabras clave:** Caso de gripe; Síntomas; Confirmación viral; Epidemiología

## Abstract

**Introduction:** For the epidemiological study of flu has established the suspected case definition but should be confirmed through virological analysis. The objective is to study the viral etiology of the samples from the sentinel network and relation with the case definition.

**Patients and methods:** We performed a prospective study in the 2013-2014 influenza season on the viral etiology of respiratory samples from the sentinel network. Viral detection was performed using a technique of RT-PCR genmic amplification in real time.

**Results:** We have studied 153 samples; corresponding 121 (79%) adults and 32 (21%) children. Of these, 60 (39.2%) were positive for influenza viruses (49 influenza A (H1N1)pdm09 and 11 influenza A (H3N2)), 55 (35.9%) were negative and in 38 (24.8%) could be detected for the presence of other virus. In 98 (64%) samples could detect the presence of viruses. In other virus 38 positive samples, were detected 20 (52.6%), rhinovirus, 6 (15.7%), coronavirus, 3 (7.8%) adenovirus 3 (7.8%), parainfluenza type 1, 3 (7.8%) Respiratory syncytial virus 1 (2.6%) bocavirus, 1 (2.6%) metapneumovirus and 1 (2.6%) enterovirus. The overall average number of symptoms that presented the 153 samples was 6.25. In influenza-positive samples was 6.45, 6.16 in the negative and 6.07 in positive to other viruses.

**Conclusions:** The current case definition used by sentinel physicians for suspected flu has low specificity. As the requirement of presenting symptoms 7 would increase the specificity.

**Keywords:** Flu case; Symptoms; Viral confirmation; Epidemiology

## Introducción

Las infecciones respiratorias agudas de etiología viral son una entidad muy frecuente que afecta a la población general y que suelen presentarse como casos esporádicos o brotes estacionales. Una de las características de estas infecciones es su sintomatología común o inespecífica, de modo que clínicamente es muy difícil realizar a priori un diagnóstico etiológico<sup>1</sup>.

La gripe es una de estas infecciones respiratorias agudas, causada por los virus gripales A y B, que se presenta de forma estacional o epidémica durante los meses invernales. Su diagnóstico generalmente se realiza de forma empírica de acuerdo con la sintomatología, aunque no es infrecuente su clasificación como cuadro gripal o pseudo-gripal. Dada la importancia epidemiológica de la gripe, se ha establecido una vigilancia activa de la misma basada en su diagnóstico clínico y virológico (redes centinela de vigilancia de la gripe, RCVG)<sup>2-4</sup>. Para ello se exige el cumplimiento de la definición de caso, que modificó la Unión Europea en 2009 en base a la aparición de la pandemia causada por el virus gripal A (H1N1)pdm09<sup>5</sup>. De este modo quedó como caso sospechoso de gripe aquel que se caracteriza por la aparición súbita (aguda) y la presencia de al menos uno de los cuatro síntomas generales: fiebre o febrícula, malestar general, cefalea o mialgia, y al menos uno de los siguientes síntomas respiratorios: tos, dolor de garganta o disnea, y, finalmente, con ausencia de otra sospecha diagnóstica<sup>2,3</sup>. Por lo tanto cualquier caso sospechoso ha de cumplir como mínimo 3 síntomas; en estos casos los médicos de la RCVG toman un frotis faríngeo y lo remiten al laboratorio de referencia comunitario de virología para establecer el diagnóstico etiológico específico y confirmar el caso<sup>6,7</sup>.

De acuerdo con los síntomas establecidos, la definición de caso de gripe utilizada por las RCVG podría considerarse como de elevada sensibilidad pero de baja especificidad. Es decir las manifestaciones clínicas que se utilizan podrían corresponder fácilmente a otros procesos respiratorios agudos de etiología viral, de modo que lo que se estaría vigilando no sería realmente gripe sino infección respiratoria aguda viral.

La implantación en nuestro laboratorio de una técnica de amplificación genómica múltiple nos ha permitido conocer y ampliar la etiología viral de aquellas muestras respiratorias remitidas por la RCVG. El objetivo del presente trabajo es estudiar prospectivamente la etiología viral de este tipo de muestras y su relación con la definición de caso.

## Pacientes y métodos

Las muestras respiratorias (frotis faríngeos), remitidas al laboratorio antes de las 48 horas de su toma y en un medio de transporte para virus (MTV, Vircell, Granada),

fueron procesadas para la detección de los diferentes virus respiratorios mediante una técnica de amplificación genómica múltiple en tiempo real, tipo RT-PCR comercial (Anyplex RV16, Seegen, South Korea), que detecta de forma simultánea la presencia de 16 virus diferentes. A lo largo de todo el procedimiento se siguieron las instrucciones del fabricante.

Así mismo, se ha analizado el número de síntomas definitorios de caso, reflejados en la hoja epidemiológica que acompañaba a cada muestra, que presentaban todas las muestras enviadas, asignándoles un número como suma de todos ellos sin dar ninguna significación especial a cada uno de ellos.

Además se ha realizado un estudio comparativo y aditivo entre los resultados preliminares obtenidos en la temporada 2012-2013 y la actual 2013-2014.

## Resultados

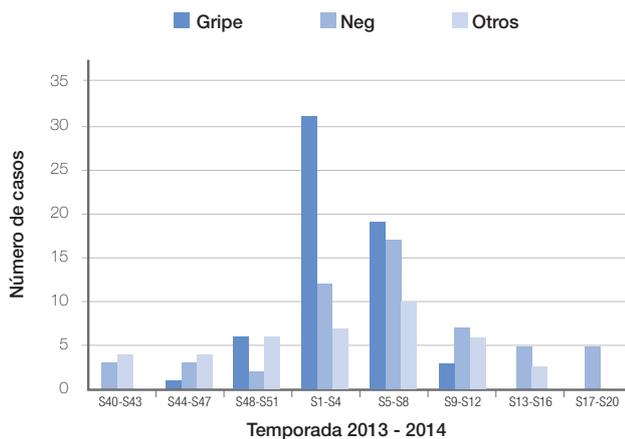
A lo largo de la temporada 2013-2014 se han estudiado 153 muestras remitidas por los médicos de la RCVG; correspondiendo 121 (79%) a adultos (>16 años) y 32 (21%) a población infantil. De ellos, 60 (39.2%) fueron positivos a los virus gripales (49 gripe A(H1N1)pdm09 y 11 gripe A (H3N2)), 55 (35.9%) negativos y en 38 (24.8%) pudo detectarse la presencia de un virus no gripal. Es decir en 98 (64%) muestras se pudo detectar la presencia de algún virus. En las 38 muestras positivas a otros virus, se detectaron 20 (52.6%) rinovirus, 6 (15.7%) coronavirus, 3 (7.8%) adenovirus, 3 (7.8%) parainfluenza tipo 1, 3 (7.8%) virus respiratorio sincitial, 1 (2.6%) bocavirus, 1 (2.6%) metapneumovirus y 1 (2.6%) enterovirus.

En el 37.5% de las muestras pediátricas pudo detectarse un virus gripal (8 A(H1N1)pdm09 y 4 (H3N2)), en el 40.6% el resultado fue negativo y en el 21.8% se pudo detectar un virus no gripal (2 rinovirus, 2 adenovirus, 1 bocavirus, 1 metapneumovirus y 1 enterovirus). En la **Figura 1** se expresan el número de casos y los resultados obtenidos en períodos mensuales (cuatrisesmanales) a lo largo de la temporada epidémica.

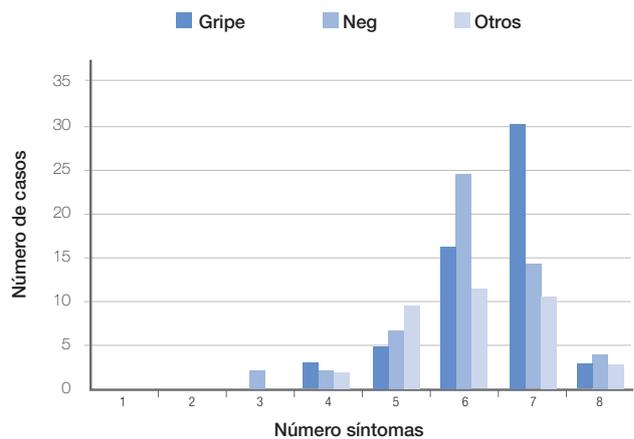
El número medio global de síntomas que presentaron las 153 muestras fue de 6.25. En las muestras positivas a gripe fue de 6.45, en las negativas de 6.16 y en las positivas a otros virus de 6.07.

En relación con el número de síntomas detectados en cada uno de los casos, en aquellos que fueron positivos a gripe, ninguno presentó 3, el 5% tenían 4, el 8.3% tenían 5, el 28.3% tenían 6, el 53.3% tenían 7 y el 5% tenían 8. En los casos negativos (sin detección viral) los porcentajes fueron del 1.8%, 3.6%, 12.7%, 47.2%, 27.2% y 7.2% respectivamente. Mientras que en aquellos casos con detección de un virus no gripal fueron ninguno con 3 síntomas, y el resto del 5.2%, 26.3%,

**Figura 1:** Resultados mensuales obtenidos en las muestras remitidas por la RCVG.



**Figura 2:** Número de síntomas definitorios de caso en relación al resultado obtenido en la muestra respiratoria.



31.5%, 28.9% y 7.8% respectivamente. En la **Figura 2** se expresa el número de casos en relación con el número acumulado de síntomas que presentaban.

En la comparación de temporadas gripales (**Tabla I**) apenas se observan diferencias en los porcentajes obtenidos en los tres tipos de resultados. En la temporada 2013-2014 se ha detectado un ligero incremento en el número y porcentaje las muestras positivas a gripe, a expensas de las negativas. Parece constante el 25% de muestras positivas a virus no gripales.

**Tabla I:** Resultados comparativos obtenidos en las dos últimas temporadas gripales epidémicas.

Temporada	Gripe*	Negativo	Otros	Total
2012-2013	55 (33.3)	68 (41.2)	42 (25.4)	165
2013-2014	60 (39.2)	55 (35.9)	38 (24.8)	153
	115 (36.6)	123 (38.6)	80 (25.1)	318

\* Número de casos (porcentaje)

## Discusión

La definición de caso de gripe se basa en una serie de síntomas generales y respiratorios que podrían corresponder a cualquier infección respiratoria aguda de etiología viral. Esta enfermedad no presenta por sí misma ningún síntoma específico o sugestivo, salvo quizás las mialgias<sup>1</sup>. Sin embargo para la vigilancia epidemiológica se ha establecido unos mínimos criterios para asegurar una máxima sensibilidad en la sospecha gripal<sup>5,8</sup>.

Los únicos que, en general, utilizan y se ciñen a los criterios definitorios de caso (sospechoso) son los médicos de las RCVG. Por ello sólo con sus muestras y datos clínicos ha podido realizarse este estudio y análisis de confirmación virológica<sup>7</sup>.

Lo que primero destaca es que tan solo el 39.2% de las muestras enviadas en la temporada 2013-2014 fueran positivas a gripe (casos confirmados); por lo tanto el resto (60.8%) de los casos o eran negativas o se detectaba un virus no gripal. Estos datos confirman el resultado obtenido previamente<sup>8</sup> y que dan al conjunto de las dos temporadas gripales un 36.6% de casos confirmados virológicamente como gripe. Estos mismos datos de positividad (37.5%) han sido detectados en la población infantil, aunque la cepa A(H1N1)pdm09 afecta preferentemente a la población joven entre 25-45 años<sup>6</sup>. La diferencia observada entre las dos temporadas es posible que se deba a los distintos tipos y subtipos gripales circulantes en ellas. En nuestra comunidad autónoma, en la temporada 2012-2013 circuló mayoritariamente la gripe B (especialmente en la población infantil) y la gripe A(H3N2); mientras que en la temporada 2013-2014 circulo casi exclusivamente la gripe A (80% A(H1N1)pdm09 y 20% A(H3N2). En un estudio previo realizado por Navarro-Marí et al.<sup>9</sup> se comprobó que sólo 199 (55.4%) de las muestras centinela cumplían los criterios definitorios de caso de gripe. De este modo el valor predictivo positivo (confirmación virológica) de las muestras que cumplían criterios de caso fue de tan solo el 36%, datos semejantes a los obtenidos por nosotros.

Como consecuencia de estos datos debería reconsiderarse la declaración cualitativa y cuantitativa (numérica) de casos de gripe, a efectos epidemiológicos. Dado que parece que tan solo un 35% de ellos se confirman por laboratorio, se estarían comunicando muchos más casos de los verdaderos, con las implicaciones numéricas que esto tendría en las tasas epidemiológicas de la gripe estacional. Evidentemente debería realizarse un estudio multicéntrico (multi-RCVG) para confirmar estos datos, pero el hecho de que coincidan en dos temporadas con circulación gripal distinta, apoyan la realidad virológica de la gripe.

También parece constante el 25% de los casos en los que se ha podido detectar un virus no gripal, lo cual confirma que se está vigilando infecciones respiratorias agudas víricas. Como cabría esperar el rinovirus (52.6%) ha sido el detectado con una mayor frecuencia en las muestras centinela, al igual que lo hace en la mayoría de muestras respiratorias<sup>10,11</sup>. Además la mayoría de estos otros virus respiratorios se detectaron tanto al principio como al final de la temporada gripal; mientras que su número descendió significativamente en el período de circulación mayoritaria del virus gripal.

Las muestras consideradas como negativas, sólo lo fueron a los virus estudiados, de modo que no puede descartarse la presencia de otros virus distintos o microorganismos no víricos. También debería considerarse la posibilidad de que algunos de ellas fueran falsamente negativas, aunque la sensibilidad de la técnica molecular utilizada (10-20 copias/ml) y los controles internos hacen difícil aceptar esta posibilidad<sup>12</sup>.

En cuanto a los síntomas clínicos de los casos, el número medio global de las 153 muestras ha sido de 6.25, es decir que independientemente del resultado virológico la inmensa mayoría cumplía ampliamente los criterios de sospecha. Las diferencias globales detectadas entre las muestras positivas a gripe y las otras no muestra una diferencia valorable, por lo tanto la suma o presencia de síntomas no le da globalmente ninguna especificidad a la definición de caso.

Sin embargo, hemos podido observar que las muestras positivas a gripe con 7 síntomas, todos menos la disnea, representaban el 53.3% de ellas; siendo este porcentaje diferencial con el resto de resultados (27.2% las negativas y 28.9% las positivas a virus no gripales). Mientras que con 6 síntomas predominaban las muestras negativas y con 8 síntomas, la totalidad, se detectaron muy pocos casos y con los tres resultados.

Así pues, concluimos que la actual definición de caso utilizada por los médicos de la RCVG para la sospecha de gripe presenta una baja especificidad para ella. Sería más correcto hablar de vigilancia de infecciones respiratorias agudas virales en la temporada gripal. Sólo la exigencia de presentar 7 síntomas permitiría incrementar esa especificidad, aunque no sabemos como afectaría a la sensibilidad global de casos de infección respiratoria aguda. El hecho de que sólo un tercio de los casos sospechosos de gripe presenten confirmación virológica, debería replantear el impacto y la carga real de la gripe, diagnosticada habitualmente sólo por la clínica, y su significación epidemiológica en la salud pública.

## Discusión

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Kidd M. Influenza viruses: update on epidemiology, clinical features, treatment and vaccination. *Curr Opin Pulm Med* 2014; 20:242-246.
- de Mateo S. La importancia de la vigilancia en el control y la prevención de la gripe. *Vacunas* 2002; 3(S1): 9-13.
- Zurriaga Llorens O, Peñalver Herrero J. Los sistemas centinela como herramienta para la vigilancia de la gripe y conocimiento de sus características. *Vacunas* 2002; 3 (S1): 14-15.
- Larrauri Cámara A, Jiménez-Jorge S, de Mateo ontañón S, Pozo Sanchez F, Ledesma Moreno J, Casas Flecha I. Epidemiología de la pandemia de gripe 2009 en España. El sistema español de vigilancia de gripe. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30(S4):2-9.
- Diario Oficial de la Unión Europea. Decisión de la comisión de las Comunidades Europeas de 28/IV/2008 que modifica la Decisión 2002/253/CE por la que se establecen las definiciones de casos para comunicar las enfermedades transmisibles a la red comunitaria, de conformidad con la Decisión nº2119/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. 1 de Mayo de 2009. L110/58-59.
- World Health Organization. Clinical management of human infection with new influenza A (H1N1) virus. [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/clinical\\_management/en/index/html](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/clinical_management/en/index/html).
- Sistema de Vigilancia de la Gripe en España. Guía de procedimientos para la vigilancia de gripe en España. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Marzo 2014.
- Reina J, López C y Red Centinela de Vigilancia de la gripe en las Islas Baleares. ¿Es gripe todo lo que clínicamente parece gripe?. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32:334-335.
- Navarro-Mari JM, Pérez-Ruiz M, Cantudo-Muñoz P, Petit-Gancedo C, Jiménez-Valera M, Rosa-Fraile M, and Influenza Surveillance network in Andalusia, Spain. *J Clin Epidemiol* 2005; 58:275-279.
- Jacobs SE, Lamson DM, St. George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26:135-162.
- Reina J, López C, Morales C, Busquets M. Análisis de las coinfecciones detectadas entre los virus gripales A y B y otros virus respiratorios, 2012-2013. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014 (En prensa).
- Kim HK, Oh SH, Yun KA, Sung H, Kim MN. Comparison of Anyplex II RV16 with the xTAG respiratory viral panel and Seeplex RV15 for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1137-1141.

# La autotoma es tan efectiva como las muestras obtenidas por el ginecólogo para la detección del HPV

*Self-sampling is as much effective as Gynecologist samples for HPV detection*

**Helia Mariño<sup>1</sup>, Enrique Serra<sup>2</sup>, Antonio Gutiérrez<sup>3</sup>**

*1 Departamento de Ginecología, 2 Departamento Anatomía Patológica, 3 Unidad de Biología Molecular. Departamento de Hematología. Hospital Universitario Son Espases. Palma de Mallorca. España.*

## Correspondencia

Dra. Helia Mariño  
Departamento de Ginecología y Obstetricia  
Hospital Universitario Son Espases  
Ctra. Valldemossa km 7,5 - 07122 Palma de Mallorca  
Tel.: 871 205 648  
E-mail: heliamarinomendez@gmail.com

**Recibido:** 16 – I – 2015  
**Aceptado:** 26 – II – 2015

**doi:** 10.3306/MEDICINABALEAR.30.01.16

## Resumen

**Objetivo:** Comparar la eficacia diagnóstica entre auto - toma de muestras y la toma hecha por el ginecólogo para la prueba del VPH .

**Sujetos y Métodos:** Se incluyeron 120 pacientes elegidas del cribado de rutina de cáncer de cuello uterino, y 120 pacientes diagnosticadas en los últimos 6 meses de LSIL. Obtuvimos consentimiento por escrito de todas las pacientes. Las muestras para la detección del HPV fueron obtenidas por un ginecólogo o con el dispositivo de autotoma, y enviadas para la prueba de VPH molecular al departamento de Anatomía Patológica en el Hospital Universitario Son Espases (Mallorca, España).

**Resultados:** En el grupo de la auto- toma se consiguió una sensibilidad del 0.76 y una especificidad del 0.83. En el grupo de muestra cervical, obtuvimos la misma sensibilidad de 0.76 y especificidad similar de 0.85.

**Conclusiones:** La concordancia entre las dos técnicas utilizando el índice Kappa fue muy buena : 0,86 ( IC del 95 % , 0,79 a 0,93).

**Palabras clave:** Cáncer de cérvix, Auto-toma, HPV, cribado

## Abstract

**Objective:** To compare the diagnostic efficacy for HPV testing between samples obtained with the Selfcitotest self-sampling device and samples obtained by gynecologists with the cervical sampler kit.

**Patients and Study design:** We included 120 patients who had come for routine screening of cervical cancer and 120 patients with a previous cytology with diagnostic of Low grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL) .We obtained written consent of all patients. Samples for molecular HPV testing were obtained by gynecologists or by self-sampling and were sent to the Pathology Department in University Hospital Son Espases (Mallorca, Spain).

**Results:** The self-sampling group achieved a sensitivity of 0.76 and a specificity of 0.83. In the cervical sampler group we obtained the same sensitivity of 0.76 and similar specificity of 0.85.

**Conclusions:** The agreement between the two techniques using the Kappa index was very good: 0.86 (CI 95%, 0.79 to 0.93).

**Keywords:** Cervical cancer, Self-sampling, HPV, screening

## Introducción

El cáncer de cuello uterino sigue siendo una causa importante de muerte en las mujeres, con 500.000 nuevos casos diagnosticados cada año en todo el mundo, la mayoría de ellas en países en desarrollo, donde carecen de programas de cribado.

El reciente descubrimiento de la relación causal entre el virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer de cuello uterino ha causado un gran avance en la comprensión de la epidemiología de la enfermedad. La tendencia decreciente en la incidencia de cáncer invasivo se produ-

ce en aquellos países con gran cobertura poblacional dentro del programa de cribado. Por lo tanto, la eficacia de los programas de cribado están relacionados con la incidencia del tumor, la técnica de la citología y, especialmente, con los problemas asociados para encontrar los pacientes de alto riesgo.

Con el desarrollo de la biología molecular han surgido nuevas técnicas de pruebas de VPH, como un complemento de la citología en el diagnóstico de cáncer de cuello uterino, ya que hay de un 25 a un 40% de falsos negativos.

El método estándar para la detección viral se basa en la captura e hibridación sistemática de ácidos nucleicos (HC 2) o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La captura híbrida 2 (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), aprobado por la FDA, detectará incluso 1 pg de ADN de VPH / mL (sensibilidad y especificidad casi igual a la PCR). Las ventajas de este nuevo método son el manejo relativamente sencillo y la buena reproducibilidad de los resultados, que lo convierten en la mejor prueba estandarizada para el VPH<sup>1</sup>.

El auto-muestreo es un nuevo enfoque que ha surgido para aumentar la captación de la detección y cribado, donde las propias mujeres realizan el muestreo vaginal para el estudio del HPV<sup>2-8</sup>. Este es un estudio para evaluar la idoneidad del sistema de auto-toma para el diagnóstico de HPV, comparado con la muestra tomada por el ginecólogo.

## Material y método

### Diseño del estudio

Este estudio piloto fue aprobado por el Comité de Ética de las Islas Baleares. Se obtuvo por escrito el consentimiento de todos los participantes.

Se incluyeron prospectivamente 120 mujeres de entre 20 y 45 años que venían de forma rutinaria a hacerse las pruebas de detección de cáncer de cuello uterino y 120 mujeres que habían sido diagnosticadas en los últimos 6 meses con LSIL (grupo de estudio de 240 mujeres en total).

Los criterios de exclusión fueron: embarazo, antecedentes de citología anormal o CIN 3, o aquellas mujeres que han recibido tratamiento para la enfermedad de cuello uterino (displasia o cáncer cervical), la historia de conización o escisión electro quirúrgica, lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (HSIL), o mujeres que previamente habían sido vacunadas con la vacuna contra el VPH.

Antes de iniciar el ensayo hicimos una citología a todas las mujeres incluidas. Los resultados anormales fueron confirmados por colposcopia y biopsia. Para el ensayo cogimos dos muestras para el diagnóstico de HPV: una recogida por el ginecólogo con el kit de toma cervical (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania) y otra muestra tomada con el dispositivo de auto-toma conocido como Selfcitotest (Quirosa, Barcelona, España) con el vial Thin Prep (Hologic Iberia, Madrid, España). Todas las muestras fueron enviadas al laboratorio de patología (Hospital Son Espases, Mallorca, España) para el test de DNA del HPV. Nuestro objetivo era evaluar la equivalencia entre ambos métodos en cuanto al test de HPV para poder ofrecer una herramienta de cribado alternativa a las mujeres.

Las muestras recogidas por el ginecólogo fueron el grupo control y las muestras con la auto-toma fueron el gru-

po de casos. Antes del muestreo se pidió a todas las pacientes cumplir con una encuesta sobre las preferencias previas entre los métodos de muestreo.

### Toma de muestras vaginales

Para evitar posibles sesgos derivados de la potencial alternación de las muestras, se dejó al azar el orden de auto-toma o la muestra tomada por un ginecólogo, de forma que algunas pacientes tenían primero la toma hecha por ginecólogo y luego hacían ellas la auto-toma, o lo contrario.

La recogida del ginecólogo fue tomada mediante la técnica habitual de extensión citológica de la muestra extraída de la zona de transformación con el kit habitual (Qiagen®). La técnica de auto-toma utilizando el dispositivo Selfcitotest fue como sigue:

Introducción del dispositivo en la vagina como un Tampon haciéndolo girar un par de veces y luego depositar el extremo insertado en la vagina en el vial ThinPrep.

Ambas muestras se enviaron al laboratorio para su análisis. Para las muestras del Selfcitotest se usaron kits Qiagen Hibryd Capture II o HC2, usando la técnica de conversión del vial de Thin Prep, como indica Qiagen. En las muestras recogidas por el ginecólogo con el vial Qiagen, la técnica de conversión no fue necesaria. El test de HC2 DNA de alto riesgo fue usado solo incluyendo la mezcla de sondas para la detección de los 13 tipos de HPV de alto riesgo.

La evaluación de los efectos adversos fue realizada tras preguntar a las mujeres si habían tenido dolor, sangrado, erosiones, o cualquier otra molestia cuando usaron el dispositivo de auto-muestreo.

### El análisis estadístico

Para estudiar la relación entre las variables clínicas categóricas, la prueba exacta de Fisher, el índice Kappa y la prueba Z se utilizaron en cada caso apropiado. Para analizar la relación entre variables cuantitativas y categóricas binarias se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney. Todos los valores de p informados fueron bilaterales y la significación estadística se definió como un valor de  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Características de la población

Las mujeres incluidas (aquellas que acudían a cribado de rutina y aquellas diagnosticadas de LSIL) fueron similares en cuanto a la nacionalidad, nivel de estudios o el trabajo. Sin embargo, el grupo de LSIL era más joven, con un mayor porcentaje de mujeres solteras, una historia menor de embarazos y el uso más frecuente de anticoncepción de barrera (**Tabla I**).

Tabla I: Características de la población

	Todas	Grupo Control	Grupo LSIL	p
<b>Edad media (rango)</b>	34 (22-46)	35 (24-46)	33 (22-46)	0.047
<b>Nacionalidad:</b>				0.58
-España	160 (67%)	78 (65%)	82 (69%)	
-Otra	78 (33%)	41 (34%)	37 (31%)	
<b>Status civil:</b>				0.007
-Casada	64 (27%)	43 (36%)	21 (17%)	
-Pareja estable	67 (28%)	34 (28%)	33 (27%)	
-Soltera	81 (34%)	30 (25%)	51 (42%)	
-Divorciada	27 (11%)	13 (11%)	14 (12%)	
-Viuda	1 (0.4%)	0 (0%)	1 (0.8%)	
<b>Nivel Académico:</b>				0.47
-Sin estudios	23 (10%)	12 (10%)	11 (9%)	
-Primaria	32 (13%)	17 (14%)	15 (12%)	
-Secundaria	135 (56%)	71 (60%)	64 (53%)	
-Universidad	50 (21%)	20 (17%)	30 (25%)	
<b>Trabajo:</b>				0.89
-En paro	62 (26%)	30 (25%)	32 (27%)	
-Estudiante	2 (0,8%)	1 (0,8%)	1 (0.8%)	
-A tiempo parcial	16 (7%)	8 (7%)	8 (7%)	
-A tiempo completo	159 (66%)	81 (67%)	78 (65%)	
-Retirada	1 (0,4%)	0 (0%)	1 (0.8%)	
<b>Historia Obstétrica:</b>				
-Embarazos	135 (56%)	76 (63%)	59 (49%)	0.027
-Abortos	70 (29%)	32 (27%)	38 (32%)	0.39
-Nacimientos	128 (53%)	70 (58%)	58 (48%)	0.12
<b>Contracepción:</b>				0.038
-Oral	150 (62%)	76 (63%)	74 (62%)	
-Preservativo	26 (11%)	6 (5%)	20 (17%)	
-Diafragma	15 (6%)	8 (7%)	7 (6%)	
-Otro	3 (1%)	2 (2%)	1 (0.8%)	
-Ninguno	46 (19%)	28 (23%)	18 (15%)	

### Comparación de ambos métodos para las pruebas de VPH

El objetivo principal de este estudio piloto fue comparar ambos métodos de muestreo (autotoma y toma del ginecólogo) para la detección del VPH.

Los resultados de las citologías realizadas a las 240 mujeres previamente a iniciar el ensayo fueron: 169 normales y 71 pacientes presentaron alteraciones citológicas. De estas, 7 eran ASCUS, 60 LSIL (lesión intraepitelial de bajo grado) y 4 HSIL (lesión intraepitelial de alto grado).

En cuanto a los resultados del ensayo comparando casos y controles, entre las muestras recogidas por el ginecólogo con diagnóstico de ASCUS, 2 fueron VPH + y 5 negativas en el test de HPV. De las 60 pacientes con LSIL, 12 fueron HPV negativas y 48 positivas. Las 4 pacientes con HSIL fueron todas VPH positivas. En frotis normales existían 26 (15 %) positivas para VPH de alto riesgo (falsos negativos) y 143 (85 %) con VPH negativo.

En el grupo de las muestras tomadas con la auto-toma (casos), los 7 ASCUS fueron 2 de ellos HPV-positivos y 5 negativos en el test de HPV. De las 60 LSIL, 48 eran VPH positivas y sólo 12 VPH negativas. De las 4 pacientes con HSIL o CIN2+ todas ellas fueron HPV positivas.

Al igual que en el grupo de muestras tomadas por el ginecólogo, en frotis normales sólo había 29 pacientes (18 %) con VPH positivo (falsos negativos) y 132 (82 %) con VPH negativo .

Usando la citología convencional como prueba estándar para la detección de enfermedad, el grupo de auto-muestreo alcanzó una sensibilidad de 0,76 y una especificidad de 0,83, con un valor predictivo positivo (VPP) de 0,65 y un valor predictivo negativo (VPN) de 0,89. En el grupo de muestras de cuello uterino se obtuvo la misma sensibilidad de 0,76 y una especificidad similar de 0,85 con un VPP de 0,67 y un VPN de 0.89 (**Tabla II**).

En última instancia ambas técnicas resultaron ser comparables para la detección de la lesión citológica a través de la detección de casos positivos de VPH. El acuerdo entre las dos técnicas que utilizan el índice Kappa fue muy bueno: 0,86 (IC del 95 %, 0,79 a 0,93).

### Evaluación de la preferencia del paciente

Antes de este estudio, se pidió a las mujeres acerca de su preferencia de toma de muestras: 173 (72 %) optaron por el método de auto-toma, mientras que 63 (26 %) prefirió la toma del ginecólogo y 4 (2 %) eran indiferentes. Las razones para elegir el método de auto-toma eran la

comodidad (66 %), flexibilidad horaria (25 %), la intimidad (4 %) o evitar la incomodidad del examen pélvico (3 %). Las mujeres que prefirieron el ginecólogo dijeron que tenían más confianza en el profesional al tomar la muestra (43 %), falta de confianza en sí mismas (25 %), inseguridad técnica acerca de si podrían realizar la prueba correctamente (8 %), o el miedo de introducir el dispositivo dentro de la vagina (5 %).

### Tolerancia

También se evaluaron los efectos adversos preguntando a las mujeres si habían tenido dolor, sangrado, erosiones, o cualquier otra molestia cuando se usa el dispositivo de auto-toma. Sólo 10 pacientes (4 %) de las mujeres inscritas, expresaron dolor al insertar el dispositivo dentro de la vagina, no hubo casos de sangrado, no hubo rotura del dispositivo en la vagina, o lesiones, ni alergias. No se observaron graves consecuencias inmediatas o a largo plazo.

## Discusión

La técnica de la citología convencional ha demostrado ser una gran prueba en los programas de cribado de cáncer de cuello uterino, y en la reducción de la mortalidad. Sin embargo, el alarmante número de falsos negativos es bien conocido (hasta un 40% según las series)<sup>9,10</sup>. Desde el descubrimiento de la asociación necesaria de la enfermedad de HPV y sus lesiones precursoras, la prueba del VPH se ha propuesto como el sustituto de la prueba del frotis para el cribado cervical, debido a la alta sensibilidad y especificidad de diagnóstico, que los ensayos clínicos ya han demostrado (sobre el 80 %)<sup>3,11,12</sup>.

Con el fin de aumentar la captación de mujeres, la auto-toma apareció en las campañas de cribado poblacional de las mujeres que no van al ginecólogo por diversas razones, tales como la distancia geográfica, la falta de cultura en salud y campañas de prevención, el rechazo a un examen pélvico, etc.

**Tabla II:** Comparación de métodos de muestreo para identificar casos patológicos usando la citología convencional como gold standard: 2-A auto-toma y 2-B toma cervical

#### 2-A: AUTO- TOMA

	Enfermedad	Salud	TOTAL
HPV-positivo	54	29	83
HPV-negativo	17	140	157
TOTAL	71	169	240

#### 2-B: TOMA CERVICAL

	Enfermedad	Salud	TOTAL
HPV-positivo	54	26	80
HPV-negativo	17	143	160
TOTAL	71	169	240

La auto-toma también puede reducir los costes considerablemente al no tener que comprometer a los profesionales para hacer la toma. Por estas razones se han realizado varios ensayos clínicos que demuestran que es posible aplicar la auto-toma para la detección de la enfermedad. Algunos ensayos clínicos afirman que la auto-toma de muestras es superior en la detección del virus a la toma hecha por el ginecólogo<sup>7,8,13,14</sup>.

Nuestro ensayo clínico demuestra que el dispositivo de auto-toma es tan eficaz como la toma hecha por el ginecólogo para la detección del VPH, con una plena aceptación por los pacientes participantes en el ensayo<sup>15</sup>, y sin efectos adversos significativos. Utilizando el índice Kappa, la concordancia entre las dos técnicas en cuanto a la detección de HPV es muy alta. Además, la auto-toma detecta más casos de HPV, en consonancia con otros estudios publicados. La auto-toma demuestra una mayor capacidad para la detección del VPH, ya que permite una mejor recogida de células de la pared vaginal respecto a la toma del ginecólogo<sup>13,14</sup>.

Con los datos anteriores se concluye que la auto-toma para la detección del virus de papiloma como técnica de cribado es muy fiable y segura, al igual que la muestra tomada por el ginecólogo. Creemos que el conocimiento de las respectivas sensibilidades de la citología convencional y la detección del virus del papiloma mediante técnicas de biología molecular deben cambiar definitivamente las campañas de cribado actuales. A través de la prevención primaria con vacunas en la población general, la mejora de la prevención secundaria y la incorporación de un cambio en las campañas de detección mediante la aplicación de la detección de virus de HPV de alto riesgo, seremos capaces de controlar mejor la enfermedad. Así, podemos racionalizar los costes sanitarios innecesarios y reducir la prevalencia y las cifras de mortalidad.

Gracias a la comodidad de la prueba de auto-toma, se pueden reducir los costes de la atención profesional especializada, eliminar las lesiones dudosas como ASCUS, e incrementar la cobertura de la población de las mujeres que no reciben las campañas de detección regulares. Por todas estas razones, creemos que las políticas de salud de cada país o comunidad deben sustituir la técnica convencional por nuevas técnicas de auto-toma de muestras para detectar el virus del papiloma humano, sobre todo en tiempos de crisis financiera y optimización de recursos.

## Agradecimientos

Agradecimientos a la empresa ACITS 06 S.L por la donación gratuita de los dispositivos de autotoma Selfcito-test y al departamento de Anatomía Patológica del Hospital Son Espases por su contribución en el desarrollo del ensayo clínico.

## Bibliografía

1. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szaewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. Overview of the european and north american studies on hpv testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006;119:1095-1101.
2. Girianelli VR, Thuler LC, Szklo M, Donato A, Zardo LM, Lozana JA, Almeida Neto OF, Carvalho AC, Matos JH, Figueiredo V. Comparison of human papillomavirus DNA tests, liquid-based cytology and conventional cytology for the early detection of cervix uteri cancer. *Eur J Cancer Prev* 2006;15:504-510.
3. Petignat P, Faltin DL, Bruchim I, Tramer MR, Franco EL, Coutlee F. Are self-collected samples comparable to physician-collected cervical specimens for human papillomavirus DNA testing? A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2007;105:530-535.
4. Seo SS, Song YS, Kim JW, Park NH, Kang SB, Lee HP. Good correlation of hpv DNA test between self-collected vaginal and clinician-collected cervical samples by the oligonucleotide microarray. *Gynecol Oncol* 2006;102:67-73.
5. Winer RL, Feng Q, Hughes JP, Yu M, Kiviat NB, O'Reilly S, Koutsky LA. Concordance of self-collected and clinician-collected swab samples for detecting human papillomavirus DNA in women 18 to 32 years of age. *Sex Transm Dis* 2007;34:371-377.
6. Wright TC, Jr., Denny L, Kuhn L, Pollack A, Lorincz A. Hpv DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. *JAMA* 2000;283:81-86.
7. Lazcano-Ponce E, Lorincz AT, Cruz-Valdez A, Salmeron J, Uribe P, Velasco-Mondragon E, Nevarez PH, Acosta RD, Hernandez-Avila M. Self-collection of vaginal specimens for human papillomavirus testing in cervical cancer prevention (march): A community-based randomised controlled trial. *Lancet* 2011;378:1868-1873.
8. Petignat P, Vassilakos P. Is it time to introduce hpv self-sampling for primary cervical cancer screening? *J Natl Cancer Inst* 2012;104:166-167.
9. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43-66.
10. Baker JJ. Conventional and liquid-based cervicovaginal cytology: A comparison study with clinical and histologic follow-up. *Diagn Cytopathol* 2002;27:185-188.
11. Bosch FX, de Sanjose S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers* 2007;23:213-227.
12. Castellsague X. Natural history and epidemiology of hpv infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110:S4-7.
13. Petignat P, Hankins C, Walmsley S, Money D, Provencher D, Poudreux K, Kornegay J, Rouah F, Coutlee F. Self-sampling is associated with increased detection of human papillomavirus DNA in the genital tract of hiv-seropositive women. *Clin Infect Dis* 2005;41:527-534.
14. Stenvall H, Wikstrom I, Backlund I, Wilander E. Accuracy of hpv testing of vaginal smear obtained with a novel self-sampling device. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007;86:16-21.
15. Kahn JA, Bernstein DI, Rosenthal SL, Huang B, Kollar LM, Colyer JL, Tissot AM, Hillard PA, Witte D, Groen P, Slap GB. Acceptability of human papillomavirus self testing in female adolescents. *Sex Transm Infect* 2005;81:408-414.

# Effects of prenatal and postnatal exposure to chlordimeform on serotonin levels in brain regions of adult's male and female rats

*Efectos de la exposición pre y postnatal al clordimeformo sobre los niveles de serotonina en regiones cerebrales de ratas adultas macho y hembra*

José Manuel García<sup>1,a</sup>, Pilar Alias<sup>1,a</sup>, María Teresa Frejo<sup>2</sup>, María José Anadón<sup>1</sup>, Miguel Andrés Capó<sup>2</sup>, and Javier del Pino<sup>2</sup>

1. Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria, Facultad de Medicina, Universidad Complutense of Madrid, Spain.

2. Departamento de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense of Madrid, Spain.

<sup>a</sup> These authors have contributed equally to this work

## Correspondencia

Javier del Pino PhD

Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria

Departamento de Toxicología y Farmacología

Avda. Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid. Spain

Tel.: 91 355 09 20 – E-mail: jdelpino@pdi.ucm.es

Recibido: 17 – XII – 2014

Aceptado: 11 – I – 2015

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.30.01.21

## Abstract

**Introduction:** Formamidines pesticides have been described to induce permanent effects on development of monoaminergic neurotransmitters systems. The mechanisms that induce these effects are not known but it has been suggested that these effects could be related to monoamino oxidase (MAO) inhibition. Chlordimeform is a formamidine pesticide which is a very weak inhibitor of MAO although it has been also described to produce neurodevelopmental toxicity.

**Objectives and methods:** The effects of maternal exposure to chlordimeform on brain region serotonin levels of male and female offspring rats at 60 days of age were evaluated. Maternal and offspring body weight, physical and general activity development were unaffected by the exposure of dams to chlordimeform (5 mg/kg bw, orally on days 6–21 of pregnancy and 1–10 of lactation). Male and female offspring were sacrificed at 60 days of age and possible alterations in the content and metabolism of 5-HT was determined in brain regions by HPLC.

**Results:** The results showed that this neurotransmitter system was altered in a brain regional-related manner. In male and female offspring, chlordimeform induced a significant decrease in the striatum and prefrontal cortex 5-HT and its metabolite 5-HIAA levels. This effect was with statistical distinction of sex in the prefrontal cortex. In contrast, chlordimeform caused an increase in 5-HT and 5-HIAA content in the hippocampus in male and female offspring with sex interaction. Chlordimeform evoked increases in 5-HT turnover in the prefrontal cortex and hippocampus from females and males respectively but evoked a decrease in these regions from males and females respectively.

**Conclusions:** The present findings indicated that maternal exposure to chlordimeform altered serotonergic neurochemistry in their offspring in prefrontal cortex, striatum and hippocampus, and those variations show that other mechanisms different from MAO inhibition are implicated.

**Keywords:** Formamidines; neurodevelopmental toxicity; chlordimeform; rats; serotonin; human risk assessment

## Resumen

**Introducción:** Se ha descrito que los pesticidas formamidínicos inducen efectos permanentes en el desarrollo de los sistemas de neurotransmisores monoaminérgicos. Los mecanismos por los que se inducen estos efectos no se conocen, pero se ha sugerido que podrían estar relacionados con la inhibición de la monoamino oxidasa (MAO). El clordimeformo, es un pesticida formamidínico, del que se han descrito efectos neurotóxicos en el desarrollo, aunque es un inhibidor muy débil de la MAO.

**Objetivos y métodos:** En el presente estudio se evaluaron los efectos sobre los niveles de serotonina en regiones cerebrales de ratas macho y hembra a los 60 días de edad tras la exposición maternal al clordimeformo (5 mg/kg de peso corporal, por vía oral en los días 6-21 de la gestación y 1-10 de la lactancia). El peso corporal de las madres y las crías, y el desarrollo físico y de la actividad general no se vieron afectados por la exposición al clordimeformo. Las crías fueron sacrificadas a los 60 días de edad y las posibles alteraciones en el contenido y metabolismo de 5-HT se determinaron en regiones cerebrales mediante HPLC.

**Resultados:** El clordimeformo indujo una disminución significativa en el cuerpo estriado y la corteza prefrontal de los niveles de 5-HT y su metabolito 5-HIAA. Este efecto fue estadísticamente influenciado por el sexo en la corteza prefrontal. Por el contrario, el clordimeformo causó un aumento del contenido de la 5-HT y de 5-HIAA en el hipocampo con influencia significativa por sexo. El clordimeformo provocó aumentos en la tasa de recambio de 5-HT en la corteza prefrontal y el hipocampo de hembras y machos respectivamente, sin embargo, provocó una disminución en estas regiones en machos y hembras respectivamente.

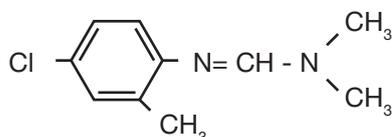
**Conclusiones:** Los presentes resultados indican que las formamidinas y en particular el clordimeformo inducen tras la exposición maternal una alteración permanente del sistema serotoninérgico de forma región y sexo dependiente en la descendencia, las cuales muy probablemente se deban a mecanismos distintos de la inhibición de la MAO.

**Palabras clave:** Formamidinas; neurotoxicidad en el desarrollo; clordimeformo; ratas; serotonina; evaluación del riesgo para el hombre

## Introduction

Chlordimeform [N2-(4-chloro-o-tolyl)-N1, N1-dimethylformamidine] (**Figure 1**) is a member of the formamidine pesticides, widely used as a broad spectrum acaricide, and in agriculture for the protection of fruits, and vegetables<sup>1</sup>. Monoamine oxidase (MAO) inhibition was among the first biochemical actions of the formamidines that were reported<sup>2-3</sup>. Thus, aminergic mechanism of action of chlordimeform was quickly postulated and adopted because neuronal MAO participates in metabolic inactivation of biogenic monoamines which include the neurotransmitters serotonin, norepinephrine, and dopamine. In addition, chlordimeform is an antagonist of reserpine effects<sup>4</sup>, alters prostaglandin synthesis<sup>5</sup>, has  $\alpha 2$  receptor agonist properties<sup>6</sup>, and is an endocrine disruptor<sup>7</sup>.

**Figure 1:** Chlordimeform chemical structure (C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>Cl N<sub>2</sub>).



Pesticides pose a growing risk to health, with a specific concern about the possible permanent effects that these compounds may have on the development of organisms. Thus, it has been described for formamidine compound amitraz, the induction of permanent alterations on the development of central nervous system (CNS) such as those that affect monoamine neurotransmitter systems, although there is not information about neurodevelopmental effects of other formamidine compounds. The mechanism by which these effects occur is not known but currently it is assumed that the monoaminergic neurotransmitters play a role during development, defined as "morphogenetic"<sup>8-11</sup>. Any change in the levels of catecholamines during development could have a profound effect on brain development, both structural and functional<sup>12</sup>. In this sense, it has been suggested as a possible mechanism of action the inhibition of MAO which may alter the levels of monoaminergic neurotransmitters, although other mechanisms as endocrine disruption on sex hormones that control the expression of enzymes that catalyze the synthesis and metabolism of the monoamine neurotransmitters cannot be excluded<sup>13</sup>.

According to all exposed above, we performed a study to establish if maternal exposure to formamidines during gestation and lactation induces permanent alterations on serotonergic system in adult age. Chlordimeform was chosen because it is the most representative compound in its group which presents a very low inhibition of MAO, allowing us to study more clearly whether the permanent changes observed on levels of serotonin neurotransmitter are due to an alteration of the enzymes that catalyze

the synthesis and metabolism of these neurotransmitter rather than inhibition of MAO.

This work focuses its interest in providing new data of formamidines induced neurotoxicity during nervous system development, because new compounds of this family are being developed with therapeutic applications for which these effects are not considered in their risk assessment, which poses a potential health hazard.

## Materials and methods

### Biological material

All experiments were performed in accordance with European Union guidelines (2003/65/CE) and Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) regarding the use of laboratory animals. Six pregnant Wistar rats were housed individually in polycarbonate cages and were assigned randomly to two experimental groups: a chlordimeform treatment group (n = 3) and a control group (n = 3).

### Test Chemical and Treatment

Chlordimeform (Sigma, Madrid, Spain) was dissolved in corn oil to provide fast and complete absorption and was administered orally by gavage in a volume of 2 mg/ml. The animals received daily chlordimeform at the dose of 5 mg/kg on days 6 to 21 of pregnancy (GD 6-21) and on days 1 to 10 of lactation (PN 1-10). Control dams received vehicle (corn oil 2.5 ml/ kg) on the same schedules. Dose of chlordimeform was selected based on previous preliminary study that indicated this dose was the higher one that did not cause weight loss or mortality, any reduction of food or water intake as well as did not induce haematological modifications of other clinical histopathological signs of overt toxicity. Moreover we did not see any changes in suckling of maternal caretaking. None of the prenatal or postnatal treatment evoked a significant change in weight of any of the brain regions on PN 60 (data not shown).

Dams were examined daily throughout the gestation and lactation periods for mortality, general appearance and behaviour. The maternal body weights were measured on GD 1, GD 5, GD 6, GD 15 and GD 20. Food and water consumption during pregnancy, length of gestation, litter size and sex ratio were also assessed.

On PN1, all litters were examined externally, sexed and weighed. Litters were organized in groups of twelve pups, six males and six females. Litters were weighed at PN 1, PN 7, PN14 and PN 21. The offspring were weaned on lactation day 21 and were maintained in appropriate conditions, housed individually and without any treatment with full access to food and water until adult age. The study was organized in treated groups of six males and six females randomly selected respectively from the dams' litters exposed to chlordimeform, and control groups of six ma-

les and six females pups randomly selected respectively from the control dams' litters.

At PN 60, male and female rats from control and treated groups (pups from control dams, and pups from dams exposed to chlordimeform, respectively) were sacrificed by decapitation. The brain was removed quickly and the hypothalamus, midbrain, medulla oblongata, cerebellum, brainstem, hippocampus, striatum and prefrontal cortex were rapidly dissected out at 4°C<sup>14</sup>. Tissues were rapidly weighed and stored at -80 °C until analysis. All data were collected by experimenters blind to the treatment condition of the offspring.

### Determination of monoamine levels

Following sample collections, 300-800 µl of 0.4 M HClO<sub>4</sub> containing 0.1% (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> was added to the tissues, and the mixture was homogenized by sonication before neurochemical evaluation was performed. The homogenates were centrifuged for 15 min at 20000 g at 4° C and aliquots of supernatants were taken for analysis of serotonin (5-HT) and its metabolite [5-hydroxy-3-indolacetic acid (5-HIAA)] using a high performance liquid chromatography (HPLC) technique with electrochemical detection<sup>15,13</sup>. Volumes of 200-300 µl of the supernatants (in 0.4 M HClO<sub>4</sub>) were treated for 3 min at 100° C in a water bath. The samples were then cooled and 30-45 µl of 2 M NaOH were added (final pH: ca. 1.5) and aliquots were injected into a reversed phase HPLC system. For the analysis of the indolalkylamines 5-HT and 5-HIAA, the mobile phase consisted of 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.1 M citric acid (pH 3.5) and 10% (v/v) methanol. Elution was performed at a flow rate of 1 ml/min and the working electrode potential was set at 0.7 V for indolalkylamines.

Peak areas in the sample chromatograms were quantitated by external standard technique using solutions of the indolalkylamines (5-HT and 5-HIAA). 5-HT turnover was calculated as ratio of metabolite to neurotransmitter.

### Data analysis

Statistical analysis of data was performed using a Statgraphics software, version Plus 4.1 for windows. Values are expressed as mean ± S.E.M. obtained from 12 animals, six males and six females, in each group (control and treated groups). For values combined for males and females, a two-way ANOVA with treatment × sex interaction was the initial test used. Where a significant treatment × sex interaction was detected, a separate Student's *t* test was carried out for each sex. The results were considered significant at *P* < 0.05. Results significantly different from controls are also presented as change from control (%).

## Results

Maternal and offspring body weight, physical and general activity development were unaffected by the ex-

posure of dams to chlordimeform (5v mg/kg bw orally on days 6 to 21 of pregnancy and 1 to 10 of lactation). No differences were found between the body weights of the control and treated dams throughout the pregnancy (data not shown). There were no significant differences in the length of gestation as well as in the litter sizes between dams receiving chlordimeform and those receiving corn oil (control group) (data not shown). Furthermore, no pups were found dead at birth and there were no differences detected in pup weights immediately after birth. Malformation or other overt signs of pesticide toxicity were neither observed. Body weights of pregnant dams and their offspring were unaffected by chlordimeform exposure. In addition, no differences were found in the general maternal behaviour of control and treated dams. Differences were not detected in the body weight of male and female offspring on days 1, 7, 14, 21 (weaning) and at 60 of life (data not shown).

Brain tissues levels of serotonin, its metabolite and the turnover in rat pups at PN 60 are presented in **Table I**. In the hypothalamus, midbrain, cerebellum, medulla oblongata and brainstem, 5-HT, 5-HIAA levels and 5-HIAA/5-HT ratio were not modified by dam exposure to chlordimeform in males and females rat pups at PN 60. In male and female offspring, chlordimeform induced a significant decrease in striatum and prefrontal cortex 5-HT and 5-HIAA levels and an increase of 5-HT and 5-HIAA levels in the hippocampus compared to control animals, displaying in the hippocampus and frontal cortex a significant sex interaction with the treatment effect (**Tables I and II**).

In striatum, the reduction of 5-HT content was 15.75% (*P* < 0.001) and 20.92% (*P* < 0.001) for 5-HIAA. In frontal cortex, the reduction of 5-HT content was a 16.99% (*P* < 0.001) and a 31.01% (*P* < 0.001) in males and females respectively and the loss in the content of 5-HIAA was a 31.56% (*P* < 0.001) and a 21.44% (*P* < 0.001) in males and females respectively. In hippocampus the increase of 5-HT content was a 31.05% (*P* < 0.001) and a 19.77% (*P* < 0.001) in males and females respectively, and the increase of 5-HIAA content was a 37.44% (*P* < 0.001) and 13.49% (*P* < 0.001) in males and females respectively. Turnover rate suffered a statistically significant reduction of 18.02% (*P* < 0.01) in males' frontal cortex and 5.08% (*P* < 0.001) in females' hippocampus. However, the turnover rate suffered a significant increase of 4.89% (*P* < 0.01) in males' hippocampus and 13, 92% (*P* < 0.001) in females' frontal cortex (**Tables I and II**).

## Discussion

The present study shows that prenatal and postnatal exposure to chlordimeform (5 mg/kg bw orally on days 6 to 21 of pregnancy and 1 to 10 of lactation) was not able to induce maternal toxicity since during pregnancy maternal weight gain of treated rats was not modified. In

**Table 1:** Tissue 5-HT and 5-HIAA concentrations in male and female rat pups observed at 60 days of age after the exposure of dams to chlordimeform (5 mg/kg bw orally on days 6 to 21 of pregnancy and 1 to 10 of lactation).

Tissue	5-HT (ng/g)		5-HIAA (ng/g)		5-HIAA/5-HT	
	Control group	Treated group (pups from treated dams)	Control group	Treated group (pups from treated dams)	Control group	Treated group (pups from treated dams)
HT	2211,69 ± 39,58	2246,49 ± 43,96	1175,98 ± 39,15	1210,17 ± 43,53	0,53 ± 0,02	0,54 ± 0,03
MB	2605,67 ± 23,42	2619,96 ± 22,86	1721,96 ± 11,30	1725,23 ± 13,72	0,66 ± 0,01	0,66 ± 0,01
CB	131,96 ± 7,43	136,73 ± 7,52	116,42 ± 4,06	120,80 ± 5,12	0,90 ± 0,06	0,90 ± 0,08
MO	1204,19 ± 28,25	1206,92 ± 43,62	838,13 ± 17,51	845,56 ± 17,22	0,70 ± 0,02	0,71 ± 0,03
BS	858,80 ± 14,96	869,82 ± 19,58	452,34 ± 9,25	456,68 ± 15,93	0,53 ± 0,01	0,53 ± 0,03
PFC	1172,90 ± 26,90	<sup>b</sup> 890,30 ± 30,44	644,05 ± 15,48	<sup>b</sup> 471,59 ± 6,84	0,55 ± 0,02	<sup>b</sup> 0,53 ± 0,02
ST	848,38 ± 4,72	714,77 ± 5,54***, <sup>a</sup> (-15,75)	726,27 ± 8,55	574,37 ± 26,03***, <sup>a</sup> (-20,92)	0,86 ± 0,01	0,80 ± 0,04
HC	534,01 ± 4,45	<sup>b</sup> 669,83 ± 16,23	474,60 ± 6,82	<sup>b</sup> 594,50 ± 20,10	0,89 ± 0,01	<sup>b</sup> 0,89 ± 0,02

HT: hypothalamus; MB: midbrain; CB: cerebellum; MO: medulla oblongata; BS: brainstem; PFC: prefrontal cortex; ST: striatum; HC: hippocampus.

Data represent means ± S.E.M. with values for males and females combined (n=12: 6 males + 6 females).

Statistical significance is reported for the \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 levels compared with the control group.

<sup>a</sup> Percentage change from control values.

<sup>b</sup> Significant treatment × sex interaction.

addition, the pesticide did not impair offspring weight; the weight was similar both in pups from treated dams and from control dams. Prenatal and postnatal maternal exposure to chlordimeform did not change the time course of male and female offspring growth and general activity, being these data in agreement with the obtained with amitraz treatment<sup>13</sup>. However, chlordimeform administered during pregnancy and lactation leads to permanent alterations of the serotonergic system in a sex and region dependent way at 60 days of age in rats. Chlordimeform affected the content of 5-HT only in the regions frontal cortex, hippocampus and striatum. The effects observed in our study included a significant decrease of serotonin and its metabolite levels in striatum and frontal cortex and an increase in hippocampus, displaying only in the prefrontal cortex and hippocampus a significant sex interaction with the treatment. Moreover, chlordimeform evoked an increase in 5-HT turnover in prefrontal cortex and hippocampus from females and males respectively but evoked a decrease in these regions from males and females respectively.

Developmental neurotoxicity involves alterations in behaviour, neurohistology, neurochemistry and/or gross dysmorphology of central nervous system occurring in the offspring, as a result of chemical exposure of the mother during pregnancy or lactation. The mechanism through which these permanent effects on serotonergic system take place is unknown, but monoamine neurotransmitters, such as 5-HT regulate brain development prior to assuming their roles as transmitters in the mature brain<sup>16-18</sup>, thus any circumstance that affects these neurotransmitters in the developing brain can alter the final structure and function of that brain. Since the endogenous levels of serotonin are highly regulated by MAO, any change in this enzyme can profoundly affect the developing brain.

In this sense, it has been reported that gestational exposure to MAO inhibitors clorgyline and deprenyl produce in offspring at 30 days of age, a significant reduction of serotonergic innervation particularly in the cerebral cortex<sup>19</sup>. Moreover, amitraz, which is a potent MAO inhibitor<sup>2</sup>, has been shown to induce permanent alterations of monomeric neurotransmitters systems<sup>13</sup> similar to those induced by chlordimeform through gestational and lactational exposure. Because chlordimeform is a very weak inhibitor of MAO, this mechanism could not support the alterations in serotonergic system observed in the present study, and thus in formamidine pesticides, suggesting other mechanisms are implicated.

On the other hand, it has been also described that steroids play a role in the development of catecholamines systems<sup>20-23</sup>, and may play a critical role in mammalian brain developmental of both sexes<sup>24</sup>. In this sense chlordimeform has been reported to disruptor different steroids hormones<sup>7</sup>, which could also contribute to the permanent effects observed. Moreover, chlordimeform could also affect the neuronal cell replication, differentiation, synaptogenesis and axonogenesis, steroid metabolism, and functional development of neurotransmitter systems, effects that could result in behavioural alterations observed in previous studies after developmental exposure to chlordimeform<sup>25</sup>. The loss of serotonergic projections could also play an important role in the behavioural alterations. Prenatal exposure to chlordimeform may result in either direct damage or enhanced vulnerability of the neurotransmitter systems to future toxic insult.

Given that the serotonergic system alteration in the brain regions of our study with chlordimeform (frontal cortex, striatum, and hippocampus) was the same as those affected by amitraz<sup>13</sup> it can be inferred that the mecha-

**Table II:** Statistical analysis for tissue values with significant treatment × sex interaction

Tissue		5-HT (ng/g)		5-HIAA (ng/g)		5-HIAA/5-HT	
		Control group	Treated group (pups from treated dams)	Control group	Treated group (pups from treated dams)	Control group	Treated group (pups from treated dams)
CF	Males	1157,41 ± 38,5	960,77 ± 2,78***, <sup>a</sup> (-16,99%)	679,37 ± 4,49	464,96 ± 8,78***, <sup>a</sup> (-31,56%)	0,59 ± 0,021	0,48 ± 0,010**, <sup>a</sup> (-18,02%)
	Females	1188,40 ± 8,72	819,82 ± 6,68***, <sup>a</sup> (-31,01%)	608,73 ± 6,96	478,23 ± 2,84***, <sup>a</sup> (-21,44%)	0,51 ± 0,01	0,58 ± 0,007***, <sup>a</sup> (13,92%)
HC	Males	536,10 ± 4,09	702,58 ± 5,21***, <sup>a</sup> (31,05%)	466,56 ± 3,45	641,25 ± 3,01***, <sup>a</sup> (37,44%)	0,87 ± 0,008	0,91 ± 0,010**, <sup>a</sup> (4,89%)
	Females	531,91 ± 5,00	637,09 ± 11,10***, <sup>a</sup> (19,77%)	482,64 ± 8,04	547,74 ± 2,39***, <sup>a</sup> (13,49%)	0,91 ± 0,011	0,86 ± 0,017***, <sup>a</sup> (-5,08%)

**PFC:** prefrontal cortex. Other tissue values were not evaluated because of the lack of treatment × sex interactions.

Values are mean ± S.E.M.; control animals (n= 6 males, n= 6 females); treated group (n= 6 males, n= 6 females).

Statistical significance is reported for the \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 levels compared with the control group within each sex as determined by one-way ANOVA, followed by the Student's t test.

<sup>a</sup> Percentage change from control values.

nism by which formamidines alter CNS development is similar. Moreover, these brain regions participate in the regulation of learning and memory processes<sup>26-31</sup>, thus, it could be considered that these processes could be compromised by exposure during gestation and lactation to formamidines. In addition, the dysfunction in serotonin system is involved in appetite, affective, neuropsychiatric disorders<sup>32-35</sup>, among others, which could be also induced by formamide exposure during development. Further studies are needed to test these functions to confirm that alteration of this neurotransmitter system is the cause of some of these dysfunctions.

## Conclusion

The results of this investigation show that formamidines, particularly the chlordimeform, cause developmental neurotoxicity at serotonergic system level. Further studies are required to determine the possible mechanisms through which formamidines induced these effects, specifically the hormonal disruption effects. It is also needed a pathologic examination in the affected regions to determine the effect on the number of neurons, to determine if there is a reduction in innervation. Currently, new molecules with therapeutic application are being developed as the N-hydroxy-N-(4-butyl-2-methylphenyl) formamide (HET0016) with protective effects against

cardiovascular and cerebrovascular diseases. Until now the risk assessment of the family of these compounds has been taken from the standpoint of carcinogenesis. In view of these results it might be appropriate to reconsider the risk assessment of the members of this family based not only on their possible carcinogenic effects but also in the neurotoxic effects during development. The results reported in this study are of great importance and should be incorporated into the risk assessment of pesticides formamidines group.

## Compliance with ethical standards

All experiments were performed in accordance with European Union guidelines (2003/65/CE) and Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) regarding the use of laboratory animals.

## Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgments

The authors thank Paula Moyano for her throughout review of this work

## References

1. JMPR (Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues) (1998). *Chlordimeform Environmental Health Criteria, No 199*. Available in: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc199.htm#PartNumber:7>
2. Aziz SA, Knowles CO. Inhibition of monoamine oxidase by the pesticide chlordimeform and related compounds. *Nature*. 1973; 242:417-418.
3. Bailey BA, Martin RJ, Downer RGH. Monoamine oxidase inhibition and brain catecholamine levels in the rat following treatment with chlordimeform. *Pest Biochem Physiol*. 1982; 17:293-300.
4. Beeman RW, Matsumura F. Chlordimeform: a pesticide acting upon amine regulatory mechanisms. *Nature*. 1973; 242(5395):273-274.
5. Yim GRW, Holsapple MP, Pfister WR, Hollingworth RM. Prostaglandin synthesis inhibited by formamidine pesticides. *Life Sci*. 1978; 23:2509-2516.
6. Wu D, Costa LG, Murphy SD. [The effect of pesticides-chlordimeform and amitraz on inhibition of the binding of <sup>3</sup>H-clonidine to alpha<sub>2</sub>-adrenoreceptor in rat forebrain tissue. *Huaxi Yike Daxue Xuebao*. 1990; 21:17-21.
7. Stoker TE, Goldman JM, Cooper RL, McElroy WK. Influence of chlordimeform on alpha-adrenergic receptor-associated mechanisms of hormonal regulation in the rat: pituitary and adrenocortical secretion. *Toxicology*. 1991; 69:257-268.
8. Buznikov GA, Shmukler YB, Lauder JM. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development. *Cell. Mol. Neurobiol*. 1996; 16(5): 533-559.
9. Levitt P, Harvey JA, Friedman E, Simansky K, Murphy EH. New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci*. 1997; 20(6) :269-274.
10. Nicotra A, Schatten G. Propranolol, a beta-adrenergic receptor blocker, affects microfilament organization, but not microtubules, during the first division in sea urchin eggs. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 1990; 16(3):182-189.
11. Nicotra A, Senatori O. Some characteristics of mitochondrial monoamine oxidase activity in eggs of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol*. 1989; C92(2):401-404.
12. Lakshmana M, Raju TR. Endosulfan induces small but significant changes in the levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the developing rat brain and deficits in the operant learning performance. *Toxicology*. 1994; 91(2):139-150.
13. Del Pino J, Martínez MA, Castellano VJ, Ramos E, Martínez-larrañaga MR, Anadón A. Effects of prenatal and postnatal exposure to amitraz on norepinephrine, serotonin and dopamine levels in brain regions of male and female rats. *Toxicology*. 2011; 287(1-3):145-152.
14. Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain – I. The disposition of [<sup>3</sup>H]norepinephrine, [<sup>3</sup>H] dopamine and [<sup>3</sup>H]DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem*. 1966; 13:655-669.
15. Colado MI, Ormazabal MJ, Alfaro MJ, Martín MI. Effect of Bay K 8644 on the synthesis and metabolism of dopamine and 5-hydroxytryptamine in various brain areas of the rat. *J. Pharm. Pharmacol*. 1993; 45:220-222.
16. Whitaker-Azmitia PM. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharm. Rev*. 1992; 43:553-561.
17. Di Pino G, Moessner R, Lesch KP, Lauder JM, Persico AM. Roles for serotonin in neurodevelopment: more than just neural transmission. *Curr. Neuropharmacol*. 2004; 2:403-417.
18. Ansorge MS, Morelli E, Gingrich JA. Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviours in mice. *J. Neurosci*. 2008; 28(1):199-207.
19. Whitaker-Azmitia PM, Zhang X, Clarke C. Effects of gestational exposure to monoamine oxidase inhibitors in rats: preliminary behavioral and neurochemical studies. *Neuropsychopharmacology*. 1994; 11(2):125-132.
20. Stewart J, Rajabi H. Estradiol derived from testosterone in prenatal life affects the development of catecholamine systems in the frontal cortex in the male rat. *Brain Res*. 1994; 646(1):157-60.
21. Leret ML, Rua C, Garcia-Montojo M, Lecumberri M, González JC. Influence of metyrapone treatment during pregnancy on the development and maturation of brain monoaminergic systems in the rat. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009; 197(4):333-40.
22. Muneoka K, Kuwagata M, Ogawa T, Shioda S. Sex-specific effects of early neonatal progesterone treatment on dopamine and serotonin metabolism in rat striatum and frontal cortex. *Life Sci*. 2010; 87(23-26):738-742.
23. Pappas SS, Tiernan CT, Behrouz B, Jordan CL, Breedlove SM, Goudreau JL, Lookingland KJ. Neonatal androgen-dependent sex differences in lumbar spinal cord dopamine concentrations and the number of A11 diencephalospinal dopamine neurons. *J Comp. Neurol*. 2010; 518(13): 2423-36.
24. Konkle ATM, McCarthy MM. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Neuroendocrinology*. 2011; 152(1): 223-235.
25. Olson KL, Boush GM, Matsumura F. Behavioral effects of perinatal exposure of chlordimeform in rats. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1978; 20(6):760-768.
26. Cifariello A, Pompili A, Gasbarri A. 5-HT (7) receptors in the modulation of cognitive processes. *Behav Brain Res*. 2007; 195(1):171-179.
27. González-Burgos I, Fera-Velasco A. Serotonin/dopamine interaction in memory formation. *Prog Brain Res*. 2008; 172:603-623.
28. Lapid MD, Morilak DA. Noradrenergic modulation of cognitive function in rat medial prefrontal cortex as measured by attentional set shifting capability. *Neuroscience*. 2006; 137: 1039-1049.
29. Dunnet SB, Meldrum A, Muir JL. Frontal-striatal disconnection disrupts cognitive performance of the frontal-type in the rat. *Neuroscience*. 2005; 135:1055-1065.
30. Compton DM. Behavior strategy learning in rat: effects of lesions of the dorsal striatum or dorsal hippocampus. *Behav Processes*. 2004; 67(3):335-342.
31. Burgess N, Maguire EA, O'keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*. 2002; 35(4):625-641.
32. Insel TR, Zohar J, Benkelf ATC, Murphy DL. Serotonin in obsessions, compulsions, and the control of aggressive impulses. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1990; 600:574-585.
33. Stein DJ, Hollander E, Liebowitz MR. Neurobiology of impulsivity and the impulse control disorders. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci*. 1993; 5(1):9-17.
34. Riederer P, Sofic E, Konradi C, Kornhuber J, Beckmann H, Dietl M, Moll G, Herbenstreit G. The role of dopamine in control of neurobiological functions. In: Fluckiger E, Muller EE, Thomer MO. (Eds.), *Basic and Clinical Aspects of Neuroscience. The Role of Brain Dopamine*. 1989. Springer. Berlin, pp. 1-17.
35. Kaye W. Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. *Physiol Behav*. 2008; 94:121-135.

# Impacto de la disfunción ventricular izquierda en el paciente intervenido de estenosis valvular aórtica moderada-grave

*Impact of left ventricular dysfunction in patients undergoing moderate to severe aortic stenosis*

**María Araceli Molina Povedano, María Riera Sagrera, Rocío Amézaga Menéndez, Miguel Fiol Sala, María Asunción Colomar Ferrà, Miguel Ángel Rodríguez Yago, Juan Pedro Martín del Rincón**

*Servicio de Cardiología. Hospital Universitario Son Espases. Palma de Mallorca*

## Correspondencia

María Araceli Molina Povedano  
Calle Son Espanyolet, num 44, 5 B.  
07014 - Palma de Mallorca. Baleares.  
E-mail: mopo.maria@gmail.com

**Recibido:** 7 - X - 2014  
**Aceptado:** 2 - XII - 2014

**doi:** 10.3306/MEDICINABALEAR.30.01.27

## Resumen

**Objetivo:** El objetivo de este estudio es analizar el efecto de la disfunción ventricular izquierda grave en la mortalidad de la cirugía de estenosis valvular aórtica aislada o combinada con cirugía coronaria en el Hospital Universitario Son Espases.

**Métodos:** Se incluyeron 666 pacientes intervenidos desde noviembre del 2002 hasta diciembre del 2009 en nuestro centro. Los pacientes se clasificaron en dos grupos según su fracción de eyección (FE):  $\leq 35\%$  y  $>35\%$ . Se excluyeron los pacientes con insuficiencia valvular aórtica severa asociada y/o los intervenidos de cualquier otra valvulopatía. El seguimiento se realizó hasta el 31 de diciembre del 2011. El análisis del efecto de la disfunción ventricular grave en la mortalidad a medio plazo se realizó mediante curvas de supervivencia y un análisis de regresión de Cox ajustado por factores de confusión.

**Resultados:** El 42,49% (n = 283) eran mujeres. La mediana de edad fue de 71,42 años (62,82 - 80,02) y la del Euroscore logístico 5,82 (3,74 - 9,15). La mortalidad bruta hospitalaria observada fue del 2,1% (n = 14). La mediana del tiempo seguimiento fue de 4,6 años, muy similar en ambos grupos. El análisis de regresión de Cox mostró una asociación entre disfunción ventricular izquierda severa y mortalidad a medio plazo (HR 2,55, IC 95% 1,36 - 4,76).

**Conclusiones:** La disfunción ventricular izquierda grave es un factor de riesgo independiente asociado con una mayor mortalidad a medio plazo en pacientes intervenidos de estenosis aórtica aislada o combinada con cirugía coronaria.

**Palabras clave:** Estenosis de la válvula aórtica, mortalidad, disfunción ventricular, procedimientos quirúrgicos cardíacos, válvula aórtica

## Abstract

**Objective:** The objective of this study was to analyze the impact of severe left ventricular dysfunction on mortality after aortic valve replacement with and without combined coronary artery bypass graft surgery in Son Espases University Hospital.

**Methods:** We included 666 patients undergoing aortic valve replacement from November 2000 through December 2009. Patients were classified in two groups according to the ejection fraction (EF):  $\leq 35\%$  and  $>35\%$ . Patients with associated severe aortic valve insufficiency or undergoing another surgical valve procedure were excluded. Mortality following discharge was calculated from data on patient life status at December 31, 2011. The effect of severe left ventricular dysfunction on mid-term mortality was analyzed with Kaplan-Meier survival estimates and a risk-adjusted Cox proportional regression model.

**Results:** The proportion of female sex was 42,49% (n = 283). Median age was 71,42 years (62,82 - 80,02) and median logistic Euroscore was 5,82 (3,74 - 9,15). Observed in-hospital mortality was 2,1% (n = 14). Median time of follow-up was 4,6 years, very similar in both groups. Cox regression analysis showed an association between severe left ventricular dysfunction and mid-term mortality (HR 2,55, CI 95% 1,36 - 4,76).

**Conclusions:** Severe left ventricular dysfunction is associated with a higher mid-term mortality in patients undergoing aortic valve replacement with and without combined coronary surgery, aortic valve.

**Keywords:** Aortic Valve Stenosis, Mortality, Ventricular Dysfunction, Cardiac Surgical Procedures, aortic valve

## Introducción

El aumento de la esperanza de vida en pacientes cardiopatas en los últimos años se relaciona, en parte, con el incremento de la incidencia de las enfermedades valvulares degenerativas susceptibles de ser tratadas con

cirugía en los países industrializados<sup>1</sup>. En este sentido, una de las enfermedades valvulares más frecuente es, en la actualidad, la estenosis aórtica calcificada en adultos (2-7% de la población  $>65$  años).<sup>2-4</sup>

Durante un periodo de tiempo largo, estos pacientes permanecen asintomáticos<sup>5</sup> y el primer síntoma puede ser un cuadro de insuficiencia cardíaca. La supervivencia de pacientes con insuficiencia cardíaca es de 1,5 años sin corrección quirúrgica.<sup>5-6</sup>

El recambio valvular aórtico es el tratamiento definitivo de la estenosis aórtica grave<sup>6</sup>. En las series actuales, la mortalidad operatoria del recambio valvular aórtico aislado es del 1-3% en pacientes <70 años y del 4-8% en los de edad más avanzada<sup>7</sup>. Se sabe que la edad avanzada y la disfunción ventricular izquierda grave<sup>8</sup> aumentan el riesgo de mortalidad operatoria.<sup>9</sup>

La disfunción ventricular podría mejorar tras la sustitución valvular, aunque cuando hay daño miocárdico ya establecido (por fibrosis o necrosis asociada), como ocurre en el infarto agudo de miocardio, puede que no mejore<sup>1</sup>. Por lo tanto, es muy importante que la cirugía combinada se realice antes de que esto ocurra.<sup>10</sup>

Debido al aumento de la esperanza de vida, el número de pacientes mayores de 70 años que se someten a cirugía cardíaca, cada vez es mayor<sup>11</sup>, más del 30% en algunos centros<sup>12</sup>. Por lo tanto, es importante saber cual es la supervivencia de estos pacientes tras la intervención quirúrgica.

Existen pocos estudios en el ámbito nacional que analicen el efecto de la disfunción ventricular en los resultados a medio plazo de la cirugía de sustitución valvular aórtica, ni tampoco los estudios más representativos son actuales. Los avances en las técnicas quirúrgicas y anestésicas y en los cuidados postoperatorios y cardiológicos han disminuido la mortalidad del paciente operado de cirugía cardíaca, a pesar de que los pacientes cada vez son más mayores y presentan más patología asociada. En este contexto, el objetivo de nuestro estudio es analizar, con datos actualizados, si la disfunción ventricular izquierda preoperatoria sigue siendo un factor de riesgo independiente de mortalidad en el paciente intervenido de estenosis valvular aórtica.

Como objetivo secundario analizaremos la supervivencia de pacientes ≥70 años (por el aumento de esperanza de vida en los últimos años) en función de la función ventricular.

## Material y métodos

### Población de estudio

Se realizó un estudio retrospectivo en el que se incluyeron 666 pacientes intervenidos consecutivamente de estenosis valvular aórtica aislada o combinada con cirugía coronaria desde el inicio de esta actividad en nuestro centro, en noviembre de 2002, hasta diciembre del 2009.

Se realizó una exploración ecocardiográfica antes de la cirugía a todos los pacientes. El examen estándar inclu-

yó el modo M, bidimensional (2D), Doppler espectral y color con obtención de planos habituales que incluyen ejes paraesternal largo y corto, planos apicales de tres, cuatro y cinco cámaras. Se analizaron parámetros relacionados con la válvula aórtica (gradiente máximo y medio, área valvular estimada por ecuación de continuidad, relación de integrales y velocidad máxima transvalvular). La fracción de eyección del ventrículo izquierdo se obtuvo en todos los pacientes por el método Teicholz y/o Simpson y por estimación visual.

Se excluyeron los pacientes menores de 18 años, aquellos con insuficiencia valvular aórtica grave asociada y/o intervenidos de cualquier otra valvulopatía.

La muestra se clasificó en dos grupos según la fracción de eyección del ventrículo izquierdo: menor o igual del 35% (FE≤35%) y mayor del 35% (FE>35%).

### Técnica quirúrgica

Los pacientes fueron intervenidos bajo circulación extracorpórea (CEC) estándar con oxigenadores de membrana a través de una esternotomía media. Se canuló la aorta ascendente y la aurícula derecha. Todos los casos se realizaron bajo hipotermia moderada pasiva. La protección miocárdica se consiguió mediante cardioplejia cristaloides intermitente anterógrada y retrógrada. Se utilizaron antifibrinolíticos en la mayoría de los casos.

En cirugías combinadas se revascularizaron aquellas arterias con lesiones coronarias moderadas, ≥ 50% del diámetro de la luz arterial como indican las guías.<sup>13</sup>

### Cuidados postoperatorios

Los enfermos fueron atendidos en la unidad de cuidados intensivos (UCI) de cirugía cardíaca durante su periodo postoperatorio con un protocolo estandarizado. Fueron dados de alta directamente a la planta de cirugía cardíaca a partir del segundo día postoperatorio, cuando se consideró que no requerían cuidados intensivos

### Base de datos

Los datos preoperatorios, intraoperatorios y postoperatorios se obtuvieron a partir de la base de datos del registro de cirugía cardíaca de nuestro hospital. Estos datos los introducen prospectivamente médicos intensivistas durante su estancia en UCI, añadiéndose posteriormente los eventos adversos ocurridos en la sala de cirugía cardíaca. Se recogieron los datos perioperatorios (incluyendo los demográficos, las comorbilidades previas a la cirugía, los resultados de laboratorio, el tipo de cirugía, las transfusiones de productos sanguíneos durante la operación y en la UCI, los efectos adversos postoperatorios, el tiempo de ventilación mecánica y el tiempo de estancia en la UCI y en el hospital) a partir de la historia clínica. La base de datos fue revisada cuidadosamente para detectar y corregir los datos omitidos o incongruentes.

## Definiciones

Las variables de interés analizadas fueron los factores de riesgo cardiovascular clásicos y las incluidas en la escala logística de valoración de riesgo quirúrgico (EuroSCORE logístico)<sup>14</sup> mediante la cual se calculó el riesgo de mortalidad para cada paciente (existe una disponibilidad on-line gratuita para el cálculo del valor logístico y aditivo en la dirección [www.EuroSCORE.org](http://www.EuroSCORE.org)).

Se consideró disfunción sistólica de ventrículo izquierdo a la fracción de eyección menor del 50% (FE<50%) y disfunción sistólica grave de ventrículo izquierdo a aquella menor o igual del 35% (FE≤35%).

La anemia preoperatorio se definió según los criterios propuestos por la OMS: hemoglobina (Hb) inferior a 13 g/dl en los hombres y Hb inferior a 12 g/dl en las mujeres.

Se consideró estenosis aórtica grave cuando el área fue menor de 1 cm<sup>2</sup>, el gradiente medio fue mayor de 40 mmHg, la velocidad máxima fue mayor de 4 m/seg o la relación de integrales menor de 0,25.

## Complicaciones cardíacas

Las complicaciones cardíacas que se analizaron durante el periodo postoperatorio fueron la fibrilación auricular, el shock cardiogénico y el infarto agudo de miocardio (IAM). Se definió el infarto agudo de miocardio ante la presencia de nuevas ondas Q o alteraciones típicas de isquemia aguda en el electrocardiograma y de un valor de la fracción MB de la creatinincinasa superior a 5 veces el límite alto de la normalidad.<sup>15</sup> El shock cardiogénico se definió como índice cardíaco <2,0 l/min/m<sup>2</sup>, con tensión arterial sistólica (PAS) < 90 mmHg (o necesidad de vasopresores para conseguir PAS ≥ 90 mmHg), presión de enclavamiento pulmonar (PCP) > 16-18 mmHg y oliguria.<sup>16</sup>

## Complicaciones no cardíacas

Las complicaciones no cardíacas incluyeron el accidente cerebrovascular agudo, la disfunción renal y las infecciones respiratorias. Se definió el accidente cerebrovascular postoperatorio como la aparición de un déficit focal neurológico persistente durante al menos 24 h y confirmado mediante una tomografía computarizada. Debido a la existencia de distintas definiciones de insuficiencia renal postoperatoria en los enfermos operados de cirugía cardíaca y con el fin de poder comparar los resultados se escogió la propuesta por Kulier et al:<sup>17</sup> el valor de creatinina sérica debía ser de 2,0 mg/dl o más y debía acompañarse de un incremento de 0,7 mg/dl o más respecto al valor basal. Los criterios para el diagnóstico de neumonía fueron los de la guía publicada por el Centro para el Control de Enfermedades.

## Variables resultado

El tiempo de ventilación mecánica se definió como el tiempo durante el cual el paciente necesitó soporte ventilatorio tras la cirugía cardíaca, desde el ingreso en la

UCI hasta la extubación, incluido el tiempo de ventilación mecánica asociado a las reintubaciones. El tiempo de estancia hospitalaria incluyó el tiempo transcurrido desde la cirugía cardíaca hasta el alta hospitalaria y el tiempo de estancia en la UCI, la duración del ingreso en la UCI tras la cirugía cardíaca, incluyendo los reingresos.

El seguimiento se realizó hasta el 31 de diciembre de 2011. La mortalidad hospitalaria se calculó identificando a todos los pacientes que fallecieron en el hospital. La mortalidad de los pacientes que fueron dados de alta vivos del hospital se consideró mortalidad al seguimiento, y se calculó a partir de la información proporcionada por el Servicio Balear de Estadística sobre el estado vital de los pacientes a 31 de diciembre de 2011.

## Análisis estadístico

Las características basales de los pacientes, los antecedentes personales y los principales resultados de morbimortalidad se expresan en frecuencias y proporciones para las variables categóricas, y como media y desviación estándar o mediana y percentil 25-75% (o rango intercuartil) para las variables cuantitativas. Se considerará un valor de p < de 0,05 estadísticamente significativo. El análisis se realizó con el test exacto de Fisher y la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

El análisis de la mortalidad intrahospitalaria se realizó con una regresión logística simple. El escaso número de defunciones en el hospital y de la mayoría de complicaciones postoperatorias no permitió realizar un análisis de regresión logística con potencia suficiente para determinar la asociación entre la mortalidad hospitalaria y la disfunción ventricular grave. El análisis de la mortalidad al seguimiento se realizó con una regresión simple de Cox y posteriormente se ajustó el efecto según las potenciales variables confundidoras y modificadoras del efecto con una regresión múltiple de Cox. Se consideraron variables confundidoras aquellos factores (elegidos por la evidencia en la literatura o por su importancia clínica) asociados a la exposición que presentaba diferencias con valores p≤0,20, una asociación entre el factor y el efecto en los no expuestos fuera del intervalo RR 0,67-1,5 si son binarios y una diferencia p≤0,30 si son cuantitativos, y que no sean considerados un factor intermedio entre la exposición y el efecto. La inclusión en el modelo ajustado de las potenciales variables confundidoras se realizó si el cambio entre el efecto ajustado y sin ajustar era superior al 10%. Entre los modelos obtenidos se eligió el modelo que estimaba con mayor precisión (menor error estándar) el parámetro β. El análisis de la supervivencia se realizó con el método de Kaplan-Meier en los pacientes que fueron dados de alta vivos del hospital. Se consideraron censurados los pacientes que estaban vivos a 31 de diciembre del 2011 y los que estaban vivos en el último contacto. Se realizó además una análisis estratificado de la supervivencia según la edad (< 70 y ≥ 70 años) en función de presentar disfunción ventricular

izquierda grave o no. Todo el análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS Statistics (versión 21.0, SPSS, Inc, Chicago,IL)

## Resultados

La media de edad de los 666 pacientes fue de 71,42 ± 8,6 años y las mujeres fueron el 32,6%. La estratificación en dos grupos según la función ventricular fue la siguiente: FE≤35% (n=46) y FE>35% (n=620). La mediana del Euroscore logístico fue de 5,82 (rango intercuartil (RIC), 3,74-9,15). La mortalidad bruta hospitalaria observada en los 666 pacientes fue del 2,1% (n=14).

En la **tabla I** se presenta un resumen de las principales variables preoperatorias de estos pacientes. En el grupo de disfunción ventricular grave hubo más cirugías combinadas, mayor prevalencia de pacientes con hipertensión pulmonar grave, enfermedad arterial periférica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) e insuficiencia renal crónica con o sin diálisis, aunque ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa. Sin embargo, en este mismo grupo, había mayor número de pacientes fumadores, de pacientes con IAM previo, de cirugías urgentes y tenían mayor puntuación en el Euroscore; diferencias que sí resultaron estadísticamente significativas.

**Tabla I:** Variables preoperatorias (n=666)

Variables	FE≤35%	FE>35%	p
Pacientes	46	620	
Edad (años)	73 (66-76)	72 (68-77)	0,749
Mujeres	15 (32,6)	268 (43,2)	0,168
Euroscore logístico	9,68 (7,6-16,7)	5,48 (3,69-8,57)	0,000
Cirugía			
Valvular	22 (47,8)	365 (58,9)	0,164
Coronaria+valvular	24 (52,2)	255 (41,1)	
Cirugía urgente	4 (8,7)	16 (2,6)	0,043
IMC, (kg/m <sup>2</sup> )	29,03 (25,66-30,77)	28,38 (25,61-31,61)	0,907
Fumador	8 (17,4)	46 (7,4)	0,025
HTA	29 (63)	439 (70,8)	0,315
IAM previo	12 (26,1)	66 (10,6)	0,007
HTP grave	3 (6,5)	19 (3,1)	0,191
Diabetes mellitus	15 (33,3)	200 (32,4)	0,871
Enfermedad arterial periférica	5 (10,9)	39 (6,3)	0,220
EPOC	10 (21,7)	77 (12,4)	0,108
Creatinina basal, (mg/dl)	1,2 (0,96-1,45)	1 (0,85-1,25)	0,002
IRC no diálisis	10 (21,7)	77 (12,4)	0,108
IRC diálisis	1 (2,2)	9 (1,5)	0,514
ACV previo	3 (6,5)	45 (7,3)	1,000
CC previa	3 (6,5)	13 (2,1)	0,092
Anemia preoperatoria	18 (40)	240 (39)	0,876

Variables cuantitativas: mediana (percentil 25-75); variables categóricas: valor absoluto (porcentaje)

IMC: índice de masa corporal; HTA: hipertensión arterial; IAM: infarto agudo de miocardio; HTP hipertensión pulmonar, EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; IRC: insuficiencia renal crónica; ACV: accidente cerebrovascular; CC: cirugía cardíaca.

En la **tabla II** se presentan las variables operatorias principales de las intervenciones practicadas. Tanto el número de injertos realizados, como los tiempos de circulación extracorpórea, de isquemia y las transfusiones, fueron muy parecidos en ambos grupos.

Las complicaciones postoperatorias (**Tabla III**) fueron infrecuentes (fibrilación auricular: 22,37%; shock cardiogénico: 1,2%; infarto agudo de miocardio: 1,5%; neumonía: 1,3% y accidente cerebrovascular: 0,9%). Los pacientes con disfunción ventricular izquierda tuvieron más neumonías, diferencia que fue estadísticamente significativa.

La mediana del tiempo de ventilación mecánica en la muestra global fue de 6 horas (4,5-11,5). Solo el 0,6% permaneció conectado a ventilación mecánica a las 72 horas de la cirugía.

La mediana de estancia en UCI de los 666 pacientes fue de 2 días (2-4) y en el hospital, 10 días (8-17).

Sin embargo, al dividir la muestra en los dos grupos, no hubo prácticamente diferencias en el tiempo de ventilación mecánica ni en la estancia en UCI, sí en la estancia hospitalaria.

La mortalidad hospitalaria fue del 2,1%, fue similar en ambos grupos. El EuroSCORE logístico fue mayor en

**Tabla II:** Características operatorias

Variables	FE≤35%	FE>35%	p
Número de injertos	2 (1-3)	2 (1-3)	0,384
Tiempo de CEC, (minutos)	92 (81,5-116,5)	92 (77-114)	0,746
Tiempo de isquemia, (minutos)	73 (65-87,5)	76 (62-91)	0,706
Hematies, (unidades)	2 (1-3)	2 (1-4)	0,885

Variables cuantitativas: mediana (percentil 25-75); variables categóricas: valor absoluto (porcentaje).  
CEC: circulación extracorpórea.

**Tabla III:** Complicaciones postoperatorias

Variables	FE≤35%	FE>35%	p
Shock cardiogénico	0 (0,0%)	8 (1,3%)	1,000
FA postoperatoria	11 (23,9%)	138 (22,3%)	0,854
Neumonía	3 (6,5%)	6 (1%)	0,02
IR postoperatoria	9 (19,6%)	103 (16,6%)	0,546
ACV postoperatoria	0 (0,0%)	6 (1%)	1,000
Tiempo de VM, (horas)	5,5 (4,29-13)	6 (4,5-11,17)	0,771
Estancia UCI, (días)	3 (2-4)	3 (2-3)	0,083
Estancia hospitalaria, (días)	11,5 (9-25,75)	10 (8-16)	0,007
Mortalidad intrahospitalaria	1 (2,2%)	13 (2,1%)	1,000
Mortalidad seguimiento	14 (31,1%)	59 (9,7%)	0,000
Seguimiento, (años)	4,69 (2,65-6,49)	4,63 (3,09-6,57)	0,827

Variables cuantitativas: mediana (percentil 25-75); variables categóricas: valor absoluto (porcentaje).

FA: fibrilación auricular; IR: insuficiencia renal; ACV: accidente cerebrovascular; VM: ventilación mecánica; UCI: unidad de cuidados intensivos.

pacientes con disfunción ventricular grave y sobrestimó la mortalidad observada en los dos grupos de edad.

La mortalidad observada al final del seguimiento fue del 11,2%. Los pacientes con  $FE \leq 35\%$  ( $n=45$ ) presentaron una mortalidad del 31,1% respecto del 9,7% de los pacientes con  $FE > 35\%$  ( $n=607$ ).

Las probabilidades de supervivencia a los 1, 3 y 5 años de los pacientes dados de alta vivos del hospital con disfunción ventricular izquierda ( $n=45$ ) fueron de 93,2%, 79,5% y 67,6% respectivamente, menor que aquellos que tenían la  $FE > 35\%$  ( $n=607$ ) (98,2%, 94,2% y 90%). Las curvas de supervivencia se muestran en la **Figura 1**. La mediana del tiempo de seguimiento de estos pacientes fue de 4,69 años (2,65-6,49) para los pacientes con disfunción ventricular izquierda grave y de 4,63 (3,09-6,57) para los pacientes con  $FE > 35\%$ , muy similar en ambos grupos.

En el estudio univariado la disfunción ventricular destaca como predictor de la neumonía (Odds ratio (OR) 7,4, intervalo de confianza (IC) del 95%, 1,7-29,54) y de la mortalidad al seguimiento de los pacientes dados de alta vivos (Hazard ratio (HR) 3,16, IC del 95%, 1,73-5,77), no ocurre lo mismo con la mortalidad hospitalaria (OR 1,04, IC del 95, 0,13-8,11).

El análisis de regresión de Cox ajustado por factores de confusión (neumonía, pacientes  $> 70$  años, Hipertensión pulmonar, Diabetes Mellitus, anemia preoperatoria, accidente cerebrovascular postoperatorio y estancia hospitalaria) mostró que la  $FE \leq 35\%$  se asoció de forma independiente con una mayor mortalidad al final del seguimiento (HR 2,55 e IC 1,36-4,76).

Cuando estratificamos por edad menor y mayor de 70 siguen manteniéndose las diferencias entre los que tiene disfunción ventricular izquierda grave y los que no (**Figura 2 y 3**).

## Discusión

Los resultados de este estudio muestran que existe una asociación entre disfunción ventricular izquierda y la mortalidad a medio plazo, sin embargo no ocurre lo mismo con la mortalidad hospitalaria. Esto ya se había objetivado en otros estudios como en el de Goldberg et al,<sup>18</sup> y podría ser debido a que la mayoría de estos pacientes no mueren por complicaciones postoperatorias, fallecen más tarde, cuando no reciben los cuidados hospitalarios. No sabemos la causa del fallecimiento, pero podría incluso no ser por motivos cardíacos.

Nuestra mortalidad hospitalaria es menor comparada con otros registros nacionales e internacionales; Halkos et al<sup>9</sup> obtuvieron una mortalidad del 5,7%, Connolly et al<sup>19</sup> del 9% y en el estudio de Powell et al<sup>5</sup> la mortalidad fue del 5,2%. Al dividir la muestra en grupos según el grado de función ventricular, nuestra mortalidad en el grupo con disfunción

ventricular izquierda sigue siendo más baja al compararnos con otros centros (Vaquette et al<sup>1</sup> 12%, Tarantini et al<sup>20</sup> 8%).

A pesar de que nuestros pacientes con disfunción ventricular izquierda grave mueren más durante el seguimiento, al compararnos con otras series nuestra mortalidad sigue siendo baja, Vaquette et al<sup>1</sup> obtuvieron una mortalidad del 36% con una media de seguimiento de 4,6 años, un 66% de los pacientes fallecidos, murieron de causa no cardíaca.

En los pacientes dados de alta vivos del hospital, la supervivencia fue buena tanto al año de seguimiento como a los 7 años. La mayor mortalidad se produjo en los pacientes con disfunción ventricular izquierda grave, aunque la supervivencia de estos pacientes fue mayor que la detectada en otras series. Halkos et al<sup>9</sup> en el año 2009 obtuvieron una supervivencia al año, a los 3 y a los 5 años de 81,7%, 71,6% y 61,9% respectivamente (teniendo en cuenta que el punto de corte para disfunción ventricular izquierda grave fue del 40%); Saxena et al<sup>21</sup> obtuvieron una supervivencia de 63,7% a los 5 años; mientras que la obtenida en nuestro estudio fue 93,2%, 79,5% y 67,6%.

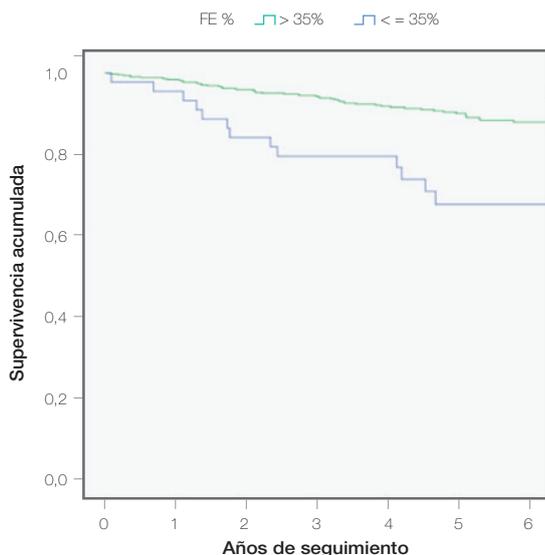
Con todo esto podemos deducir que es importante intervenir quirúrgicamente a los pacientes con estenosis aórtica grave antes de que desarrollen disfunción ventricular. Hay estudios que demuestran que la hipertrofia ventricular izquierda ya es un factor de riesgo que puede aumentar la mortalidad de estos pacientes<sup>22</sup> y otros que recomiendan la cirugía antes de que los pacientes presenten síntomas.<sup>23-24</sup> Por lo tanto es importante intervenir quirúrgicamente de forma precoz para optimizar el tratamiento y mejorar la supervivencia de estos pacientes<sup>18</sup>. Se necesitan más estudios para decidir el momento óptimo de la cirugía,<sup>25</sup> antes de que se produzca la disfunción ventricular.

Pensamos que el efecto sinérgico de factores, como la meticulosidad en la cirugía cardíaca realizada (difícil medición) y la buena organización de los cuidados intensivos postoperatorios en UCI, pueden explicar la incidencia tan baja de complicaciones y de mortalidad hospitalaria en nuestra serie. Existe una plena cooperación multidisciplinaria entre los distintos servicios implicados en los procedimientos quirúrgicos y una aplicación estricta de los protocolos de indicación quirúrgica, además de las técnicas idóneas y las medidas preventivas.

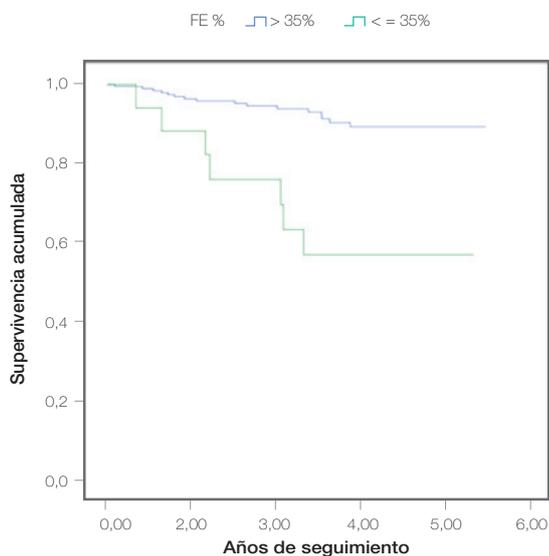
Al estratificar por edad menor y mayor de 70 años siguen manteniéndose las diferencias entre los que tienen disfunción ventricular izquierda grave y los que no, por lo que estos pacientes deben intervenir quirúrgicamente antes de desarrollar la disfunción ventricular izquierda.<sup>26</sup>

Observando las curvas de supervivencia para los dos grupos de edad, podemos deducir que los pacientes mayores de 70 años con disfunción ventricular izquierda sobreviven más que los menores de 70 años con  $FE \leq 35\%$ ; sin embargo, un tercio de estos pacientes son rechazados para ciru-

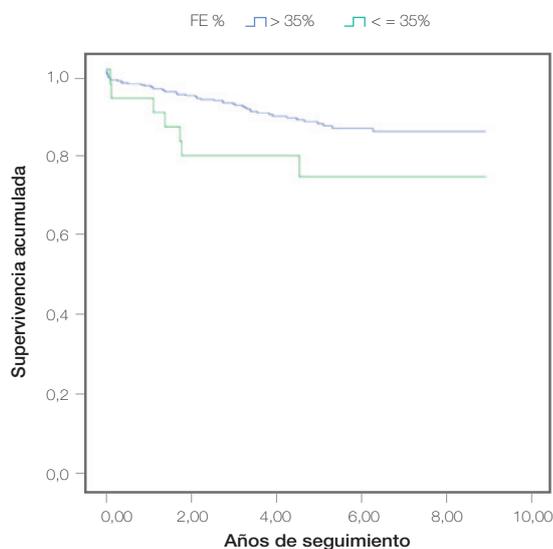
**Figura 1:** Curva de supervivencia según la función ventricular



**Figura 2:** Curva de supervivencia de los pacientes <70 años



**Figura 3:** supervivencia de los pacientes ≥70años



gía por su alta comorbilidad como puede ser la disfunción neurológica, además de la edad, y porque suelen tener una fracción de eyección del ventrículo izquierdo menor del 50%,<sup>27</sup> que no suelen recuperar tras la cirugía a diferencia de los pacientes más jóvenes. Estos pacientes con disfunción ventricular izquierda sometidos a tratamiento médico tienen un pronóstico malo a corto plazo, sin embargo aquellos que reciben tratamiento quirúrgico sobreviven más tiempo.<sup>27</sup> No existe ningún método para identificar aquellos pacientes mayores que se beneficiarían de una cirugía de sustitución valvular aórtica y solo el juicio clínico de los equipos multidisciplinares determinará la decisión terapéutica.<sup>28</sup> Por lo tanto, a la vista de nuestros resultados, son pacientes que no deberíamos rechazar solo por la edad, aunque tengan disfunción ventricular izquierda.

Este estudio tiene algunas limitaciones. Las conclusiones derivadas de un estudio observacional basadas en los resultados de un solo centro tienen una aplicación muy limitada. Es frecuente observar en este tipo de estudios que las variables examinadas como posibles factores de riesgo preoperatorio, el tipo de cirugía, las complicaciones postoperatorias no siempre coinciden, lo cual también dificulta la comparación.

No dividimos la muestra entre pacientes a los que se les realizó sustitución valvular aórtica aislada y cirugía combinada con revascularización coronaria.

Otra limitación del estudio es que no se estableció una misma duración para el seguimiento de todos los pacientes dados de alta vivos después de la cirugía cardíaca.

Tampoco hicimos una valoración de la calidad de vida al final del seguimiento, aunque otros estudios realizados en nuestro país muestran que los pacientes operados en cirugía cardíaca con una supervivencia correcta a medio y largo plazo presentan buena capacidad funcional y una calidad de vida equivalente a la de la población general española.<sup>29</sup>

No todos los estudios ponen el punto de corte de FE ≤35% cuando hablan de disfunción ventricular izquierda grave y esto hace que la comparación con otras publicaciones sea difícil.

No sabemos la causa del fallecimiento de nuestros pacientes.

En conclusión, la disfunción ventricular izquierda grave es un factor de riesgo independiente asociado con una mayor mortalidad a medio plazo. Por lo tanto es importante recordar que los pacientes deben ser intervenidos quirúrgicamente de forma precoz, antes de que la función ventricular izquierda se deprima. Con respecto a los pacientes más ancianos, son pacientes que no deberíamos rechazar para tratamiento quirúrgico solo por la edad, aunque tengan disfunción ventricular izquierda; deberíamos valorar otras comorbilidades y trabajar mediante equipos multidisciplinares para tomar las decisiones correctas.

## Bibliografía

1. Vaquette B, Corbineau H, Laurent M, Lelong B, Langanay T, de PC, et al. Valve replacement in patients with critical aortic stenosis and depressed left ventricular function: predictors of operative risk, left ventricular function recovery, and long term outcome. *Heart* 2005;91:1324-9.
2. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Barwolf C, Levang OW, et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J* 2003;24:1231-43.
3. Soler-Soler J, Galve E. Worldwide perspective of valve disease. *Heart* 2000;83:721-5.
4. Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med* 1999;341:142-7.
5. Powell DE, Tunick PA, Rosenzweig BP, Freedberg RS, Katz ES, Applebaum RM, et al. Aortic valve replacement in patients with aortic stenosis and severe left ventricular dysfunction. *Arch Intern Med* 2000;160:1337-41.
6. Flores-Marin A, Gomez-Doblas JJ, Caballero-Borrego J, Cabrera-Bueno F, Rodriguez-Bailon I, Melero JM, et al. Long-term predictors of mortality and functional recovery after aortic valve replacement for severe aortic stenosis with left ventricular dysfunction. *Rev Esp Cardiol* 2010;63:36-45.
7. ElBardissi AW, Shekar P, Couper GS, Cohn LH. Minimally invasive aortic valve replacement in octogenarian, high-risk, transcatheter aortic valve implantation candidates. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;141:328-35.
8. McCarthy PM. Aortic valve surgery in patients with left ventricular dysfunction. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2002;14:137-43.
9. Halkos ME, Chen EP, Sarin EL, Kilgo P, Thourani VH, Lattouf OM, et al. Aortic valve replacement for aortic stenosis in patients with left ventricular dysfunction. *Ann Thorac Surg* 2009;88:746-51.
10. Beach JM, Mihaljevic T, Svensson LG, Rajeswaran J, Marwick T, Griffin B, et al. Coronary artery disease and outcomes of aortic valve replacement for severe aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:837-48.
11. Calvo D, Lozano I, Llosa JC, Lee DH, Martin M, Avanzas P, et al. [Aortic valve replacement in octogenarians with severe aortic stenosis. Experience in a series of consecutive patients at a single center]. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:720-6.
12. Rodriguez R, Torrents A, Garcia P, Ribera A, Permanyer G, Moradi M, et al. Cardiac surgery in elderly patients. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:1159-68.
13. Hillis LD, Smith PK, Anderson JL, Bittl JA, Bridges CR, Byrne JG, et al. 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:e123-e210.
14. Roques F, Michel P, Goldstone AR, Nashef SA. The logistic EuroSCORE. *Eur Heart J* 2003;24:881-2.
15. Riera M, Herrero J, Ibanez J, Campillo C, Amezcaga R, Saez de Ibarra JJ, et al. Mid-term survival of patients undergoing major cardiac surgery. *Rev Esp Cardiol* 2011;64:463-9.
16. Perez Vela JL, Martin Benitez JC, Carrasco GM, de la Cal Lopez MA, Hinojosa PR, Sagredo M, V, et al. Clinical practice guide for the management of low cardiac output syndrome in the postoperative period of heart surgery. *Med Intensiva* 2012;36:e1-44.
17. Kulier A, Levin J, Moser R, Rumpold-Seitlinger G, Tudor IC, Snyder-Ramos SA, et al. Impact of preoperative anemia on outcome in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 2007;116:471-9.
18. Goldberg JB, DeSimone JP, Kramer RS, Discipio AW, Russo L, Dacey LJ, et al. Impact of preoperative left ventricular ejection fraction on long-term survival after aortic valve replacement for aortic stenosis. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2013;6:35-41.
19. Connolly HM, Oh JK, Orszulak TA, Osborn SL, Roger VL, Hodge DO, et al. Aortic valve replacement for aortic stenosis with severe left ventricular dysfunction. Prognostic indicators. *Circulation* 1997;95:2395-400.
20. Tarantini G, Buja P, Scognamiglio R, Razzolini R, Gerosa G, Isabella G, et al. Aortic valve replacement in severe aortic stenosis with left ventricular dysfunction: determinants of cardiac mortality and ventricular function recovery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;24:879-85.
21. Saxena A, Paramanathan A, Shi WY, Dinh DT, Reid CM, Smith JA, et al. Impact of left ventricular dysfunction on early and late outcomes in patients undergoing concomitant aortic valve replacement and coronary artery bypass graft surgery. *Cardiol J* 2013;20:423-30.
22. Mihaljevic T, Nowicki ER, Rajeswaran J, Blackstone EH, Lagazzi L, Thomas J, et al. Survival after valve replacement for aortic stenosis: implications for decision making. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135:1270-8.
23. Rosenhek R, Binder T, Porenta G, Lang I, Christ G, Schemper M, et al. Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *N Engl J Med* 2000;343:611-7.
24. Miller LE, Miller VM, Acers LD. Asymptomatic severe aortic stenosis with left ventricular dysfunction: watchful waiting or valve replacement? *Clin Med Res* 2013;11:51-3.
25. Henkel DM, Malouf JF, Connolly HM, Michelena HI, Sarano ME, Schaff HV, et al. Asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in patients with severe aortic stenosis: characteristics and outcomes. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:2325-9.
26. Shibayama K, Watanabe H, Tabata M, Sasaki S, Fukui T, Umemura J, et al. Impact of ejection fraction on long-term outcome after elective aortic valve replacement in octogenarians with aortic stenosis. *Circ J* 2012;76:1761-7.
27. Iung B, Cachier A, Baron G, Messika-Zeitoun D, Delahaye F, Tomos P, et al. Decision-making in elderly patients with severe aortic stenosis: why are so many denied surgery? *Eur Heart J* 2005;26:2714-20.
28. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, III, Guyton RA, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;148:e1-e132.
29. Viana-Tejedor A, Dominguez FJ, Moreno YM, Moreno R, Lopez De SE, Mesa JM, et al. Cardiac surgery in octogenarian patients: evaluation of predictive factors of mortality, long-term outcome and quality of life. *Med Clin (Barc)* 2008;131:412-5.

■ ■ | Siempre,  
estaremos a su lado



Para ocuparnos de su salud en su crecimiento, en su juventud y en todas las etapas de la vida.

Esa es una realidad para cuantos han nacido con nosotros y siguen confiando a ASISA el cuidado de su salud.

Para ASISA es una satisfacción y un estímulo que queremos compartir con cuantos integran nuestro cuadro médico. Es una forma de entender la asistencia sanitaria que nos distingue y constituye una de las señas de identidad de nuestra Compañía.

- asisa **salud**
- asisa **plus**
- asisa **autónomos**
- asisa **empresas**
- asisa **dental**
- asisa **hospitalización**
- asisa **accidentes**
- asisa **previsión**

Y ahora también:

**asisa**  
*vida*

**asisa**   
**Somos médicos**

asisa Baleares Pere Dezcallar i Net, 10 • 07010 Palma de Mallorca • Tels: 971 72 24 46/ 971 71 46 84 • e-mail: [jvillar@asisa.es](mailto:jvillar@asisa.es)

asisa contrata 901 10 10 10 | asisa informa 902 010 010 | [asisa.informacion@asisa.es](mailto:asisa.informacion@asisa.es) · [www.asisa.es](http://www.asisa.es)

# Cambios de la severidad de la regurgitación aórtica durante el esfuerzo ¿Disminuye la insuficiencia aórtica con el ejercicio?

*Changes to the severity of aortic regurgitation during exertion, does aortic insufficiency decrease with exercise?*

**Lucía Pasamar Márquez<sup>1</sup>, José Francisco Forteza Albertí<sup>2</sup>, Antonio Rodríguez Fernández<sup>2</sup>, Pere Pericás Ramis<sup>2</sup>, Andrés Carrillo López<sup>3</sup>, Antoni Figuerola Roselló<sup>1</sup>**

1 Servicio de Cardiología. Hospital de Manacor. 2 Servicio de Cardiología. Hospital Universitario Son Espases.

3 Servicio de medicina intensiva. Hospital Universitario Son Espases.

## Correspondencia

José Francisco Forteza Albertí  
Servicio de Cardiología. Hospital Universitario Son Espases  
Ctra. Valldemossa km 7,5 - 07122 Palma de Mallorca  
E-mail: jfortezalbert@gmail.com

Recibido: 26 – IX – 2014

Aceptado: 2 – XII – 2014

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.30.01.35

## Resumen

**Introducción y objetivos:** Se ha constatado que pacientes con insuficiencia aórtica avanzada (IAo) y función ventricular normal (FVN) pueden alcanzar registros deportivos de alto rendimiento. Ello podría deberse a la reducción de la regurgitación por acortamiento del tiempo diastólico en la taquicardia y/o al descenso del gradiente diastólico aortoventricular. El objetivo del estudio es valorar la capacidad funcional, volúmenes ventriculares y la fracción de regurgitación (FR) en esfuerzo en pacientes con IAo importante y FVN.

**Material y métodos:** Hemos realizado un estudio eco-Doppler basal y durante esfuerzo en cicloergómetro horizontal a 15 pacientes (11 hombres 4 mujeres, 41±20 años) con IAo III (10 casos) o IV/IV (5 casos) y FVN. Además de medidas de cavidades izquierdas y función ventricular, de parámetros convencionales de cuantificación de la insuficiencia, se valoró la FR basal y a máximo esfuerzo.

**Resultados:** Doce pacientes (80%) presentaron índice de volumen de V.I. aumentados. Todos alcanzaron niveles aceptables de esfuerzo y capacidad funcional. No hubo aumento valorable del índice E/e' al esfuerzo (7,97±2 vs 7,81±2,4 ns). La FR basal promediada fue 41±12 % y en esfuerzo se redujo en todos (media 23±14 % p<0,01) con un porcentaje de reducción de 44±29%. En tres pacientes la reducción medida de la FR fue superior al 80%. Únicamente en dos la reducción fue inferior al 15% de la basal. La mayoría de los parámetros habituales para valorar la IAo. no fueron útiles durante el ejercicio.

**Conclusiones:** **1)** Los pacientes con IAo III o IV/IV y FVN muestran buena capacidad funcional sin aumento valorable de las presiones de llenado medidas no invasivamente. **2)** La severidad de la IAo se reduce significativamente durante el ejercicio en la mayoría de los pacientes lo que permite que no se resienta su rendimiento físico.

**Palabras clave:** Insuficiencia aórtica, ecocardiografía, ecocardiografía de estrés

## Abstract

**Introduction and aims:** It has been confirmed that patients with severe aortic regurgitation (AR) and normal ventricular function (NVF) can achieve high performance in sports. This could be due to the decrease of the regurgitation by decreasing diastolic time in tachycardia and/or to the decrease of aorto-ventricular diastolic gradient. The aim of this study is to assess functional capacity, ventricular volumes and regurgitation fraction (RF) during exertion in patients with severe AR and NVF.

**Material and methods:** We have carried out a basal echo Doppler test, during exertion in horizontal cycle ergometer in 15 patients (11 men and 4 women, 41±20 years old) with AR III/IV (10 cases) or IV/IV (5 cases) and NVF. In addition to measuring left cavities, ventricular function, and conventional parameters for quantifying aortic regurgitation, the basal RF was also assessed during maximum exertion.

**Results:** Twelve patients (80%) presented increasing left ventricular volume index. All patients achieved acceptable levels of exertion and functional capacity. There was not a measurable increase of the E/E' ratio regarding exertion (7.97±2 versus 7.81±2.4 NS). The average basal RF was 41±12% and it decreased in all patients during exertion (average 23±14% P<0.01) with a decrease percentage of 44±29%. In three patients the average RF decrease was higher than 80%. Only in two patients the decrease was lower than 15%. Most parameters habitually used to assess AR were not useful during exercise.

**Conclusions:** **1)** Patients with AR III or IV/IV and NVF show good functional capacity without a measurable increase of filling pressure by non-invasive measurement. **2)** AR severity significantly decreases during exercise in most patients and therefore does not affect their physical performance.

**Keywords:** Aortic Regurgitation, echocardiography, stress echocardiography

## Introducción

La insuficiencia valvular aórtica es una valvulopatía relativamente frecuente cuya prevalencia es muy variable: 4,9% en el Framingham Heart Study<sup>1</sup> realizado en población caucásica y 10% en el Strong Heart Study<sup>2</sup> realizado en indios americanos. La prevalencia de regurgitación moderada a severa fue de 0,5% y 2,7% respectivamente.

La causa más común de regurgitación en países en vías de desarrollo es la enfermedad reumática. En cambio, en países desarrollados la enfermedad reumática es ahora rara y es más frecuente la etiología congénita (válvula aórtica bivalva) o la degenerativa (ectasia anulo-aórtica).

Existe una clasificación funcional basada en el mecanismo de la misma (El Khoury et al.<sup>3,4</sup>) que describe tres tipos de regurgitación:

- La **tipo I** se define por movilidad normal de las cúspides valvulares con dilatación de alguno de los componentes de la raíz aórtica (anillo aórtico, senos de Valsalva o unión sinotubular).
- La **tipo IIa** se define por movimiento aumentado de las cúspides en forma de prolapso con jet de regurgitación aórtica excéntrico.
- La **tipo IIb** se define por movimiento aumentado de las cúspides por fenestración del borde libre con jet de regurgitación excéntrico.
- La **tipo III** se define por cúspides de poca movilidad y/o calidad (rigidez y engrosamiento valvular con movilidad reducida, destrucción tisular por endocarditis, calcificación con movilidad reducida).

En el caso de la válvula aórtica bicúspide existe un mecanismo mixto por dilatación de la raíz aórtica (**tipo I**) que puede combinarse con un movimiento aumentado o restrictivo de los velos.

En los últimos años se han multiplicado los estudios experimentales para una mejor comprensión de los mecanismos que provocan la regurgitación valvular aórtica. En un artículo reciente de Pastora Gallego<sup>5</sup> se clasifican dichos mecanismos cuya descripción se fundamenta en el análisis detallado de la geometría de los velos, de la dirección del jet regurgitante y de las dimensiones de los componentes de la raíz de aorta. Es importante recordar que, en no pocas ocasiones, la insuficiencia aórtica es causada por múltiples mecanismos.

La válvula aórtica bicúspide es la valvulopatía congénita más frecuente (Roberts 1970<sup>6</sup>) con una prevalencia entre el 1% y el 2% de la población general y un predominio en el sexo masculino (Osler 1886<sup>7</sup>; Basso, Boschello et al. 2004<sup>8</sup>; Siu and Silversides 2010<sup>9</sup>). En un 20% de

los casos degenera en una regurgitación severa y en un 60% en dilatación de la aorta ascendente o del arco aórtico. Al ser más habituales los exámenes médicos preventivos y el acceso a la ecocardiografía, el diagnóstico de enfermedad valvular aórtica es más frecuente en edades tempranas (Basso, Boschello et al. 2004<sup>10</sup>). Como consecuencia, el hecho de que el deporte se realice de forma intensa en las primeras 3 o 4 primeras décadas de la vida, determina que sea cada vez más frecuente el hallazgo de aorta bicúspide en deportistas. En un interesante artículo de revisión sobre enfermedades de la raíz aórtica en deportistas (Yim 2013<sup>11</sup>), se indica que en 12 de los 122 trabajos analizados el hallazgo de aorta bicúspide es cada vez más frecuente, siendo la prevalencia similar a la de la población general.

La repercusión que puede tener el entrenamiento sobre la válvula aórtica a corto y largo plazo es desconocida en la actualidad. El tipo de ejercicio que mayor demanda ventricular izquierda provoca y como consecuencia mayor compromiso puede ejercer sobre el tracto de salida es el de alto componente dinámico y moderado estático (Mitchell, Haskell et al. 2005<sup>12</sup>). El aumento de la frecuencia cardíaca durante el ejercicio físico supone un acortamiento del tiempo de diástole, que es el momento en el que se produce el flujo sanguíneo en el subendocardio (Sugiura, Iwasaka et al. 1990<sup>13</sup>; Sugiura, Iwasaka et al. 1993<sup>14</sup>; Duncker and Bache 2008<sup>15</sup>).

Se ha constatado que pacientes (entre ellos conocidos deportistas de élite) con insuficiencia aórtica avanzada (IAo) y función ventricular normal (FVN) pueden alcanzar registros deportivos de alto rendimiento.

La ecocardiografía es la técnica de imagen cardíaca que permite tanto el diagnóstico de la insuficiencia aórtica valvular como la cuantificación de su severidad. Asimismo posibilita la valoración sistemática de la función ventricular y el tamaño y grosor de las cavidades cardíacas. Su reducido coste, su inocuidad y su fácil acceso permiten un seguimiento periódico tanto de la valvulopatía como de la función ventricular. La ecocardiografía en esfuerzo es una técnica utilizada no sólo como prueba de detección de isquemia sino también para conocer el comportamiento de las valvulopatías durante el ejercicio<sup>16</sup>. El cicloergómetro en decúbito parcial es la técnica más frecuentemente empleada para el estudio dinámico de las enfermedades valvulares.

En base a lo anteriormente señalado, nos hemos planteado estudiar a pacientes asintomáticos afectados de insuficiencia aórtica para conocer su comportamiento al esfuerzo; el objetivo de este trabajo pretende valorar la capacidad funcional, volúmenes y función ventricular (sistólica y diastólica), y fracción de regurgitación de la válvula aórtica durante el ejercicio en pacientes con insuficiencia aórtica III o IV y función sistólica ventricular izquierda basal conservada.

La hipótesis que planteamos es que durante el ejercicio físico el grado de insuficiencia aórtica disminuye en pacientes con función ventricular conservada lo que permite mantener una capacidad funcional elevada en los pacientes portadores de esta valvulopatía.

## Material y método

Hemos estudiado pacientes de la población general que presentaran los siguientes criterios de inclusión: insuficiencia aórtica de grado III o IV según los criterios de la AHA, función sistólica ventricular izquierda conservada, y sujetos asintomáticos en clase funcional I de la NYHA y en ritmo sinusal. Los criterios de exclusión fueron la existencia de estenosis aórtica o valvulopatía Mitral o Tricúspide mayor de I/IV, la existencia de arritmias persistentes, la mala ventana ecográfica que impidiera el estudio o la presencia de enfermedades sistémicas o anomalías físicas o psíquicas que imposibiliten la práctica de ejercicio.

Existen parámetros cualitativos y cuantitativos que definen el grado de la severidad de la insuficiencia aórtica. Los criterios usados que definen la severidad de la insuficiencia aórtica según la AHA<sup>17</sup> son:

- Parámetros estructurales: aurícula izquierda dilatada, valvas aórticas anormales, batiente o con defecto amplio de coaptación.
- Parámetros doppler: THP <200, reversión pandiastólica prominente en el flujo diastólico de aorta descendente.
- Parámetros cuantitativos: anchura de vena contracta >0,6 cm, la anchura del chorro de I Ao ocupa el 65% o más del TSVI, volumen regurgitante es mayor o igual a 60 mL/latido, fracción de regurgitación es mayor o igual al 50%, área del orificio regurgitante efectiva es mayor o igual a 0,3 cm<sup>2</sup>.

**Ecocardiografía.** Todos los pacientes fueron sometidos a ecocardiografía transtorácica mediante un aparato General Electric Vivid 7, equipado con transductores Phased Array de 2,0 y 4,0 MHz. Las medidas se realizaron tanto en modo M como en modo bidimensional, Doppler espectral pulsado y continuo y Doppler codificado en color, según los criterios y recomendaciones de la sociedad Americana de ecocardiografía. Todos los registros se llevaron a cabo por cardiólogos experimentados en esta técnica y acreditados para su manejo.

Se realizaron las siguientes **mediciones en reposo**:

- **Parámetros clínicos:** Tensión arterial, superficie corporal, Frecuencia cardiaca (FC) y ECG de 12 derivaciones.
- **Cavidades izquierdas:** Índice volumen de la aurícula izquierda, diámetro telediastólico del ventrículo izquier-

do (DTDVI), diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo (DTSVI), índice volumen diastólico del ventrículo izquierdo por el método biplano.

- **Función ventricular:** cálculo de índices generales de función ventricular (fracción de eyección por diversos métodos: Teicholz y Simpson, y fracción de acortamiento).
- **Grado de la insuficiencia aórtica:** Anchura del jet del tracto de salida del ventrículo izquierdo (TSVI), Área color I Ao en el plano de máxima visualización, velocidad máxima de la I Ao, Fracción de regurgitación (FR).

Para el cálculo de la FR empleamos la fórmula clásica y se precisó medir: diámetro del anillo mitral, Integral velocidad tiempo (VTI) del anillo mitral, volumen latido (VL) mitral, Diámetro del TSVI, VTI del TSVI, VL del TSVI. Calculándose de la siguiente forma:

$$FR: \frac{\text{Vol. Lat. Ao} - \text{Vol. Lat. Mitral}}{\text{Vol. Lat. Ao}} \times 100$$

$$\text{Vol. Latido (Vol. Lat)} = \text{VTI} \times \text{Área (Del tracto de salida de VI o del anillo Mitral)}$$

Para el cálculo del área se asumió que tanto el anillo Mitral como el tracto de salida eran de configuración circular, midiéndose en ambos casos el diámetro del mismo y calculándose el área como:  $\text{Área} = D/2 \times 3,14$ , donde D es el diámetro correspondiente.

- **Parámetros de función diastólica:** Onda E y A del llenado mitral, relación E/A, e' del anillo mitral mediante doppler tisular, en ambos lados, septal y lateral del anillo, relación E/e'.

**Ejercicio.** Tras la realización del ecocardiograma en reposo, todos los sujetos realizaron una prueba de esfuerzo, siguiendo un protocolo de carga con carga inicial de 25 watts y aumentando la carga 25 watts cada dos minutos en un cicloergómetro (General electric Vivid 7) especialmente diseñado para la obtención de imágenes en esfuerzo. El criterio de interrupción de la prueba fue el máximo esfuerzo que el paciente podía alcanzar.

Se realizaron las siguientes mediciones en el esfuerzo:

- Tensión arterial
- Tiempo de ejercicio
- Watts
- FC alcanzada
- Grado de la insuficiencia aórtica: Anchura del jet del tracto de salida del ventrículo izquierdo (TSVI), Área color I Ao, velocidad máxima de la I Ao, Fracción de regurgitación (FR).
- Reducción FR basal-esfuerzo
- Parámetros de función diastólica: E del llenado mitral, e' del anillo mitral, E/e'.

Para el **análisis estadístico** hemos empleado el programa SPSS de Windows y se han realizado los siguientes test:

- **Prueba t de Student para datos apareadas.**
- **Para variables cualitativas:** Método de análisis de varianza ANOVA.
- **Medidas de asociación.** Estimación del **grado de asociación lineal** entre el **% de reducción** de la I Ao tras esfuerzo, mediante coeficiente de correlación de Pearson.
- **Análisis Multivariado:** Modelo de regresión lineal para conocer variables independientes. Método de Stepwise.
- Se considera estadísticamente significativo la obtención de una  $p < 0,05$ .

## Resultados

Hemos estudiado 15 pacientes de la población general de 41 años de edad ( $\pm 20$ ), de los cuales 11(73%) eran varones y 4 (23 %) mujeres. Dentro de la clasificación de la gravedad de la valvulopatía, el 66 % son del grupo III (10) y el 34 % del grupo IV (5). En lo referente a la etiología de la valvulopatía: siete pacientes presentaban válvula aórtica bicúspide, tres dilatación de la aorta ascendente, dos anuloectasia aórtica, en dos el mecanismo era por retracción de velos y en uno por esclerosis valvular degenerativa. Todos presentaban función sistólica ventricular izquierda conservada (FE superior al 50 %). Doce pacientes (80%) presentaron índice de volumen de V.I. aumentados.

**Test de Kolmogorov-Smirnov.** Todas las variables analizadas mostraron una distribución normal, excepto el grado de I Ao y el sexo.

Los **parámetros basales** se resumen en las **tablas I y II**.

En la **figura 1** se visualiza en un plano ecocardiográfico de 5 cámaras el jet de la insuficiencia aórtica en doppler color extendido dentro de la cavidad ventricular en diástole.

En la **figura 2** se objetiva un plano ecocardiográfico de la anchura del jet de la insuficiencia aórtica en el tracto de salida ventricular en modo M.

En la **tabla III** exponemos las principales variables promediadas con la desviación standard.

Los **parámetros medidos en el esfuerzo** más relevantes fueron los que se detallan en la **tabla IV**.

Tabla I: Parámetros basales clínicos

Paciente	Edad (años)	Sexo	Superficie corporal (cm <sup>2</sup> )	FC (lpm)	TA (mm Hg)
1	29	V	185	65	119/55
2	80	V	198	67	152/83
3	28	V	181	55	123/66
4	56	F	165	70	135/67
5	55	F	173	77	140/73
6	23	V	187	71	145/76
7	33	V	187	55	135/61
8	12	V	116	68	87/37
9	65	V	185	62	144/83
10	15	F	165	60	113/69
11	55	V	214	72	140/90
12	34	F	168	72	122/76
13	36	V	174	74	163/77
14	70	V	180	70	158/61
15	22	V	218	74	132/69

V= Hombre F= Mujer; FC: frecuencia cardiaca; TA: tensión arterial.

Tabla II: Parámetros basales ecocardiográficos

Paciente	FE Simpson	FE Teicholz	DTDVI/D TSVI (mm)	Grado I Ao	FR (%)	Anchura jet TSVI (mm)	Área color I Ao (cm <sup>2</sup> )	E/e'
1	59%	50%	71/53	IV	48 %	12	13	5,5
2	67%	51%	74/54	IV	47 %	11	9	6
3	59%	60%	57/39	III	30 %	10	3,4	5,2
4	61%	50%	61/46	III	54 %	10	6,7	6
5	50%	54%	54/39	III	26 %	7	2,7	12
6	55%	68%	58/36	IV	27 %	11	6	6
7	50%	50%	57/43	III	55 %	11	3,5	7,5
8	63%	68%	54/33	IV	44 %	12	8,9	9
9	59%	63%	63/41	III	20 %	6	3	12
10	50%	64%	53/37	III	44 %	8	4	6
11	54%	60%	51/35	III	24 %	8	3,6	9
12	65%	51%	54/40	III	44 %	11	6,6	6
13	51%	71%	58/34	III	44 %	11	5	10
14	69%	65%	60/38	III	51 %	7	4	11
15	58%	64%	57/37	IV	54 %	7	6,6	6

FE: fracción de eyección; DTDVI: diámetro telediastólico ventrículo izquierdo; DTSVI: diámetro telesistólico ventrículo izquierdo; FR: fracción regurgitación; TSVI: tracto de salida del ventrículo izquierdo; I Ao: insuficiencia aórtica.

Figura 1

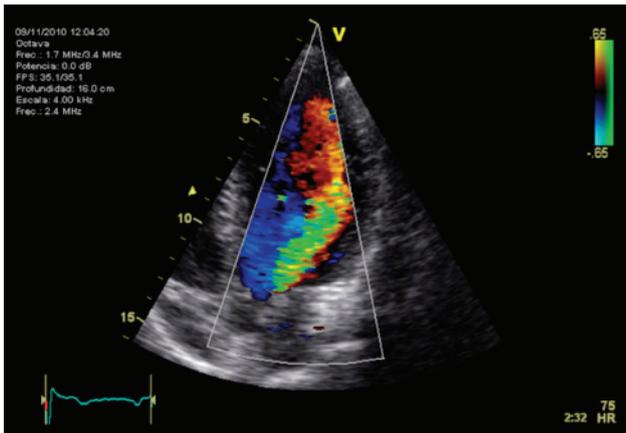
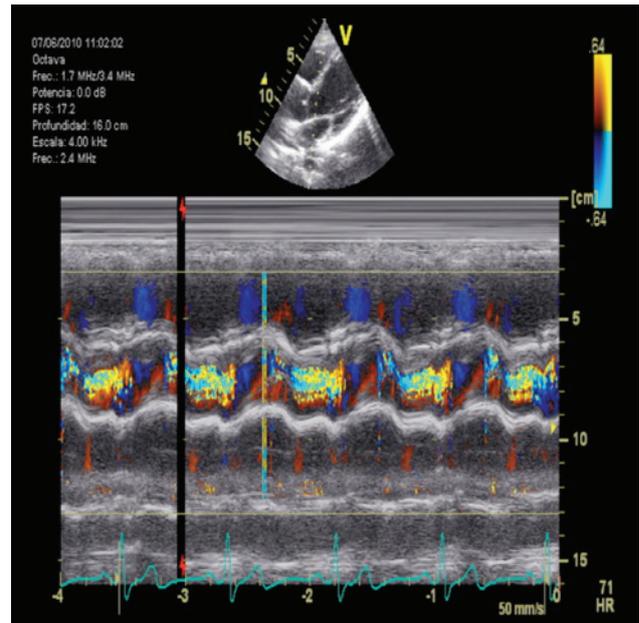


Figura 2



- Todos alcanzaron niveles aceptables de esfuerzo y capacidad funcional (el 66% alcanzaron el 80% de su frecuencia cardiaca máxima teórica).

- No hubo aumento valorable del índice E/e' al esfuerzo ( $7,97 \pm 2$  vs  $7,81 \pm 2,4$  ns).

- La mayoría de los parámetros habituales para valorar la IAo no fueron útiles durante el ejercicio debido a la taquicardia y a la imposibilidad de obtener imágenes adecuadas mediante Doppler Color.

### Fracción de regurgitación

La fracción de regurgitación (FR) basal promediada fue  $41 \pm 12$  %. La FR basal en esfuerzo se redujo en todos (media  $23 \pm 14$  %  $p < 0,01$ ) con un porcentaje de reducción de  $44 \pm 29$ %. En tres pacientes la reducción medida de la FR fue superior al 80%. Únicamente en dos la reducción fue inferior al 15% de la basal.

Tabla III: Principales variables con la desviación standard

	FC basal (lpm)	FC alcanzada (lpm)	Tiempo ejercicio (segundos)	InVol AI (mL/m <sup>2</sup> )	In Vol VI (mL/m <sup>2</sup> )	FE Simpson (%)	Anchura jet I Ao (mm)	E/e' Basal	E/e' Esfuerzo
Media	67	147	565	31	95	58%	9	7,97	7,81
Ds	6	17	173	7	22	6%	2	+/- 2	+/-2,4

Ds: desviación standard; In Vol AI: volumen aurícula izquierda indexado; In Vol VI: volumen ventrículo izquierdo indexado.

Tabla IV: Parámetros en el esfuerzo

Paciente	FC (lpm)	% FC Máx.	Watts	Tiempo ejercicio (segundos)	FR %	Anchura jet TSVI mm	Área color IAo (cm <sup>2</sup> )	E/e'	% reducción FR
1	158	82%	150	688 seg	7	9	3,3	9,1	85 %
2	125	89%	75	320 seg	18	10	4	8,8	62 %
3	132	68%	150	720 seg	7	4	4,4	6	77 %
4	137	83%	100	450 seg	43	9	5,6	6,2	20 %
5	160	96%	75	360 seg	22	4	1	10	15 %
6	167	84%	150	690 seg	11	15	6,5	6,5	59 %
7	154	82%	225	1034 seg	38	9	7,5	7	31 %
8	180	86%	100	390 seg	14	11	8,2	10	68 %
9	142	91%	125	567 seg	0	4	3,7	10	100 %
10	162	79%	125	510 seg	37	9	2,5	6	16 %
11	120	72%	150	629 seg	22	10	2,6	10	10 %
12	160	86%	125	495 seg	42	16	5,5	6	5 %
13	145	78%	100	480 seg	36	12	3,6	6	18 %
14	123	82%	125	494 seg	33	7	3,3	12	35 %
15	150	75%	150	650 seg	23	10	5,5	6	57 %

FC: frecuencia cardiaca; % FC Máx.: % de la frecuencia cardiaca máxima; FR: fracción de regurgitación; TSVI: tracto de salida del ventrículo izquierdo; IAo: insuficiencia aórtica.

La reducción de la FR fue mayor en las insuficiencias más severas que en las de grado III (66±11% versus 33±31%,  $p < 0,03$ ).

#### **Relación % reducción FR-grado de insuficiencia aórtica (moderada versus severa).**

El porcentaje medio de reducción fue 44±29%, mayor en pacientes con I Ao IV/IV que con I Ao III/IV (66'2±11 vs 32, 7±31%,  $p < 0, 03$ ).

#### **Relación % reducción FR-frecuencia cardiaca basal.**

El % de reducción regurgitación tuvo una correlación inversa ligera con la frecuencia cardiaca basal. (R de Pearson - 0, 39).  $p < 0,05$ .

#### **Relación % reducción FR- volumen ventricular izquierdo indexado.**

Existe una relación baja pero significativa entre el volumen ventricular y la reducción (R de Pearson de 0,355)  $p < 0,05$ .

#### **Relación % reducción FR- volumen auricular izquierdo indexado.**

Existe una relación baja (R de Pearson de 0,357) entre ambos  $p < 0,05$ .

## **Discusión**

Las valvulopatías constituyen una patología cardiaca cuya frecuencia e importancia en nuestro medio ha aumentado en los últimos años en relación al incremento en la esperanza de vida y a que son causa de significativa mortalidad y morbilidad en la población general<sup>18</sup>.

Los escasos estudios epidemiológicos sobre éstas<sup>1, 21</sup> quedan anticuados dado que la epidemiología de este amplio y heterogéneo grupo ha cambiado dramáticamente en los países desarrollados en los últimos 50 años. En la actualidad se ha convertido en infrecuente la etiología reumática y ha ganado importancia la degenerativa<sup>19</sup>.

Históricamente la enfermedad valvular ha sido poco estudiada en relación a otras cardiopatías debido a que suponen un grupo muy heterogéneo de muy diversas etiologías que frecuentemente pasan inadvertidas. Muchas de ellas se presentan clínicamente de forma tardía requiriendo intervenciones relevantes tras su presentación clínica. Supone todo un reto su diagnóstico precoz para conseguir una optimización del tratamiento con la consecuente mejora del pronóstico de los pacientes.

Dada la necesidad de nuevos estudios epidemiológicos sobre esta entidad, en la actualidad se está realizando un

estudio poblacional prospectivo en Europa (Ox VALVE population cohort<sup>20</sup>) cuyo objetivo es estudiar la prevalencia de las valvulopatías en la población general y el impacto que supondría establecer un programa de screening ecocardiográfico de valvulopatías u otras afecciones cardiacas.

La ecocardiografía doppler es fundamental para el estudio de las enfermedades valvulares. No solo detecta la valvulopatía sino que aporta información anatómica y funcional, ayuda a entender el mecanismo fisiopatológico, cuantificar la severidad de la misma y sus repercusiones<sup>21</sup>.

Las limitaciones del examen físico y del electrocardiograma en la detección de algunas alteraciones estructurales cardiacas como las valvulopatías y la accesibilidad de la ecocardiografía ha llevado a plantearse en nuestro país la incorporación del ecocardiograma al menos en la primera valoración inicial de deportistas de competición para mejorar la eficacia de los programas de prevención de la muerte súbita del deportista. (Grazioli et al.)<sup>22</sup>

Es todo un reto determinar el impacto del screening ecocardiográfico en otros grupos poblacionales con el objetivo de diagnosticar precozmente valvulopatías significativas que en un futuro pudieran empeorar el pronóstico del paciente.

Gracias al estudio ecocardiográfico cada vez tenemos más información acerca de la estructura cardiaca, y concretamente valvular, tanto en deportistas como en la población general, lo que permite estudiar mejor la dinámica de las diferentes patologías.

Centrándonos en nuestro estudio, los pacientes eran tanto deportistas como no deportistas. Tras la realización de la prueba de esfuerzo con cicloergómetro evidenciamos que solo 5 de 15 pacientes (33%) alcanzaron el 85% de la frecuencia cardiaca máxima teórica (submáxima), pero en 13 de los 15 pacientes se alcanzó el 75% de la máxima teórica. Los motivos para parar la prueba antes de alcanzar la frecuencia submáxima fueron casi siempre fatiga muscular y/o mala adaptación al tipo de ejercicio o al cicloergómetro. Con estos resultados podría ser criticado que la prueba de esfuerzo no fuera máxima en ninguno de los casos, pero sabemos que esta intensidad de ejercicio realizada es suficiente para la valoración de la dinámica cardiaca y para poner de manifiesto el efecto del mismo sobre la regurgitación aórtica. Astrand et al.<sup>23</sup> estudian la dinámica cardiaca en personas sometidas a prueba de esfuerzo con cicloergómetro submáxima y máxima concluyendo que el máximo volumen/latido se alcanza con un trabajo equivalente al 40% del consumo máximo de oxígeno y a una frecuencia cardiaca media de 110 lpm. Durante el ejercicio a una intensidad entre el 40% y el 100% del consumo máximo de oxígeno la variación del volumen latido fue mínima (de alrededor del 4%).

En los resultados de nuestro estudio objetivamos que existe una reducción significativa de la insuficiencia aórti-

ca durante el ejercicio y que esta reducción es mayor en las insuficiencias más severas.

Existen tres hipótesis acerca de los mecanismos que podrían explicar este hallazgo y por tanto justificar este paradójico grupo de valvulopatías con excelente rendimiento deportivo. En primer lugar la taquicardia sinusal durante el ejercicio hace que disminuya el tiempo de diástole y en consecuencia el tiempo en que tiene lugar la regurgitación. Por esta razón en cada ciclo cardíaco se acortaría el tiempo y por ello la cantidad de sangre que regresaría de la aorta hacia el ventrículo izquierdo.

En segundo lugar durante el ejercicio se abren las arteriolas y capilares de los músculos en esfuerzo lo que redundaría en un descenso de las resistencias vasculares periféricas y una caída de la presión diastólica aórtica; esto provocaría la disminución del gradiente aortoventricular por lo cual el flujo regurgitante descendería en cada latido.

Por último el aumento del volumen ventricular provocado por la sobrecarga volumétrica podría contribuir a la adaptación cardíaca al ejercicio como mecanismo adaptativo que aumenta el gasto cardíaco y favorecería una buena capacidad de esfuerzo. Se debe recordar que los estudios ecocardiográficos realizados en deportistas muestran un aumento de las cavidades izquierdas. A su vez esta adaptación facilitada al ejercicio aumentaría el rendimiento de la víscera en situación de estrés físico y minimizaría la fracción de regurgitación durante el esfuerzo. El hecho de hallar una correlación significativa entre la bradicardia basal y los volúmenes ventriculares y auriculares con el grado de reducción de la fracción de regurgitación apoya esta interpretación. Tanto el aumento de volumen como la bradicardia basal son hallazgos frecuentes en los deportistas.

Otro posible mecanismo explicativo del buen rendimiento deportivo de estos pacientes es que el ejercicio podría mejorar la tolerancia del corazón a la insuficiencia aórtica ya que al reducir la regurgitación en términos relativos y absolutos mejoran el rendimiento y la función diastólica en corazones sometidos a una sobrecarga de volumen crónica tal como es el caso de la insuficiencia aórtica severa<sup>24</sup>.

Únicamente hemos encontrado un estudio en la literatura sobre la reducción de la insuficiencia aórtica durante el ejercicio que obtiene similares resultados al nuestro (Stern et al.<sup>25</sup>). Se estudiaron 12 pacientes que fueron evaluados con resonancia magnética cardíaca de forma basal y tras un ejercicio submáximo. Aunque la resonancia cardíaca tiene limitaciones en el estudio de la insuficiencia aórtica respecto a la ecocardiografía, aun así se objetivó una reducción relativa significativa ya que tanto el estudio basal y el post- esfuerzo se evaluaron de la misma forma.

Revisando las últimas guías de 2014 sobre valvulopatías de la sociedad americana de cardiología<sup>26</sup>, es llamativo que en la insuficiencia aórtica severa asintomática se

recomiende el test de esfuerzo para confirmar la clase funcional de estos grupos de pacientes. Podríamos preguntarnos qué sintomatología esperamos desencadenar con el esfuerzo si la regurgitación se reduce con el mismo. Solo en casos de insuficiencia valvular aguda o en casos de claudicación de la función ventricular esperaríamos encontrar limitación sintomática de la capacidad funcional; pero la insuficiencia aórtica crónica es una sobrecarga volumétrica bien tolerada durante mucho tiempo si no existe otro tipo de insulto sobre el miocardio. Es una interesante cuestión que podría modificar los criterios y las indicaciones de la prueba de esfuerzo en el manejo de esta valvulopatía.<sup>27</sup>

## Limitaciones del estudio

El número de pacientes estudiados es demasiado corto para extraer conclusiones definitivas lo que a su vez limita el conocimiento de que factores se correlacionan con el proceso en estudio.

Por otra parte pocos pacientes alcanzaron frecuencia cardíaca submáxima lo que también impide averiguar hasta qué punto el ejercicio es capaz de reducir el grado de la regurgitación a frecuencias superiores

El hecho de realizar el ejercicio con un cicloergómetro dificulta la adaptación al mismo de un porcentaje de pacientes. Es probable que utilizando una cinta treadmill de tapiz rodante se hubieran alcanzado resultados más contundentes.

## Conclusiones

La fracción de regurgitación disminuye marcadamente durante la práctica de ejercicio en pacientes con insuficiencia aórtica crónica avanzada con buena función ventricular. Este hecho ayuda a que sea una valvulopatía bien tolerada y que no afecta negativamente al rendimiento deportivo mientras la función ventricular esté bien conservada.

## Bibliografía

1. Jagmeet P Singh, Jane C Evans et al. (1999). "Prevalence and clinical determinants of mitral, tricuspid, and aortic regurgitation (the Framingham Heart Study)". *The American Journal of Cardiology*, Volume 83, Issue 6, 15 March 1999, Pages 897-902.
2. Lebowitz NE, Bella JN, et al. (2000). "Prevalence and correlates of aortic regurgitation in American Indians: the Strong Heart Study". *J Am Coll Cardiol*. 2000 Aug; 36(2):461-7.
3. Khoury, G El; Glineur, et al. "Functional classification of aortic root/valve abnormalities and their correlation with etiologies and surgical procedures". *Current Opinion in Cardiology*: March 2005 - Volume 20 - Issue 2 - pp 115-121. Valvular heart disease.
4. Boodhwani M, de Kerchove L, et al. "Repair-oriented classification of aortic insufficiency: Impact on surgical techniques and clinical outcomes". *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Volume 137, Issue 2, Pages 286-294, February 2009.
5. Pastora Gallego, Marinela Chaparro, et al (2014). "Valoración ecocardiográfica de la anatomía funcional de la insuficiencia aórtica durante la cirugía de reparación valvular". *Cir Cardiovasc*. 2014; 21(3):181-189.
6. Roberts, W. C. (1970). "The congenitally bicuspid aortic valve: a study of 85 autopsy cases." *The American journal of cardiology* 26(1): 72-83.
7. Osler, S. W. (1886). *The bicuspid condition of the aortic valves*, Wm. J. Doman.
8. Basso, C., M. Boschello, et al. (2004). "An echocardiographic survey of primary school children for bicuspid aortic valve." *The American journal of cardiology* 93(5): 661-663.
9. Siu, S. C. and C. K. Silversides (2010). "Bicuspid aortic valve disease." *Journal of the American College of Cardiology* 55(25): 2789-2800.
10. Basso, C., M. Boschello, et al. (2004). "An echocardiographic survey of primary school children for bicuspid aortic valve." *The American journal of cardiology* 93(5): 661-663.
11. Yim, E.S. (2013). "Aortic Root Disease in Athletes: Aortic Root Dilation, Anomalous Coronary Artery, Bicuspid Aortic Valve, and Marfan's Syndrome." *Sports Medicine* 43(8): 721-732.
12. Mitchell, J. H., W. Haskell, et al. (2005). "Task Force 8: classification of sports." *Journal of the American College of Cardiology* 45(8): 1364-1367.
13. Sugiura, T., T. Iwasaka, et al. (1990). "Effect of propranolol on diastolic time during exercise." *J Cardiovasc Pharmacol* 15(3): 371-376.
14. Sugiura, T., I. Iwasaka, et al. (1993). "Effect of infarct site on diastolic time during exercise." *Chest* 103(6): 1749-1754.
15. Duncker, J. and R. Bache (2008). "Regulation of coronary blood flow during exercise." *Physiol Rev* 88: 1009-1086.
16. Bhattacharyya S, Kamperidis V, et al. "R. Senior: Clinical utility and prognostic value of appropriateness criteria in stress echocardiography for evaluation of valvular heart disease". *Eur Heart J*. 2013 suppl1.
17. From Zoghbi WA, Enriquez-Sarano M, et al. (2003). "Recommendations for evaluation of the severity of native valvular regurgitation with two-dimensional and Doppler echocardiography". *Journal of the American Society of Echocardiography*, 2003; 16:777-802.
18. Nkomo VT, Gardin JM et al. "Burden of valvular heart diseases: a population-based study". *Lancet*. 2006. Sep 16; 368(9540): 1005-11.
19. D'Arcy JL, Prendergast BD, et al. "Valvular heart disease: the next cardiac epidemic". *Heart*. 2011; 97:91-3.
20. Coffey S, d'Arcy JL, et al. "The OxVALVE population cohort study (OxVALVE-PCS)-population screening for undiagnosed valvular heart disease in the elderly: study design and objectives". *Open Heart*. 2014; 1e000043. doi:10.1136/openhrt-2014-000043.
21. Lancellotti P, Tribouilloy C, et al. "Recommendations for the echocardiographic assessment of native valvular regurgitation: an executive summary from the European Association of Cardiovascular Imaging". *European Heart Journal – Cardiovascular Imaging* (2013) 14, 611-644 doi:10.1093/ehjci/jet105.
22. Graziola G, Merinoa B, et al. "Utilidad del ecocardiograma en la revisión preparticipativa de deportistas de competición". *Rev Esp Cardiol*. 2014;67(9):701-705
23. Astrand P, Cuddy E, et al. "Cardiac output during submaximal and maximal work". *Journal of Applied Physiology*. 1 March 1964 Vol. 19 no. 2, 268-274
24. Lachance D, Champetier S, et al. "Effects of exercise in volume overload: insights from a model of aortic regurgitation". *Med Sci Sports Exerc*. 2009 Jun; 41(6):1230-8.
25. Stern H, Calavrezos L, et al. "Physical Exercise Reduces Aortic Regurgitation: Exercise Magnetic Resonance Imaging". *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014 Mar; 7(3):314-5.
26. Nishimura R, Otto CM, et al. "2014 AHA/ACC Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines". *Circulation*. March 3, 2014.
27. Vahanian A, Alfieri O, et al. "Guidelines on the management of valvular heart disease". *Eur Heart J*. 2012; 33: 2451-96.

# Pathological mineralization of calcium phosphate

## *Mineralización patológica de fosfato cálcico*

**Félix Grases<sup>1</sup>, Otakar Sohnel<sup>2</sup>**

1. Laboratory of Renal Lithiasis Research, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS),  
University of Balearic Islands, Palma de Mallorca, Spain

2. University of J.E. Purkyně, Faculty of Environmental Studies, Ústí n.L., Czech Republic

### Correspondencia

Félix Grases Freixedas

Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS)

Universidad de las Islas Baleares. Ctra. Valldemossa km 7,5

07122 - Palma de Mallorca

E-mail: fgrases@uib.es

Recibido: 21 - I - 2015

Aceptado: 29 - I - 2015

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.30.01.43

### Abstract

Based on the study of non-infected calcium phosphate renal calculi, solid concretions formed in simulated body fluid and calcific deposits formed in human aortic valves, two different mechanisms of hydroxyapatite (HAP) formation are described. In a mechanism, the formation of spherical HAP particles takes place via aggregation of Posner's clusters present in the liquid, after reaching a certain size gradually settled in the liquid and became incorporated into developing concretion. In the other mechanism, the microcolumnar HAP crystals were nucleated on randomly distributed detritus of organic origin embedded in the compact phase.

**Keywords:** Biological hydroxyapatite, formation mechanism, renal calculi, aortic valve, body fluid

### Resumen

Basándonos en estudios de los cálculos renales no infecciosos, concreciones sólidas obtenidas *in vitro* utilizando fluidos biológicos simulados y depósitos calcificados formados en válvulas aórticas humanas, se describen dos mecanismos diferentes que explican el desarrollo de la hidroxapatita (HAP). En uno de los mecanismos, la formación de nanopartículas esféricas de HAP tiene lugar a través de la agregación de macroespecies de Posner presentes en el líquido, que a su vez se agrupan mediante nucleación superficial formando concreciones de mayor tamaño. En el otro mecanismo, la formación de cristales microcolumnares de HAP tiene lugar mediante procesos de nucleación heterogénea sobre detritus de materia orgánica localizados en espacios confinados y poco irrigados.

**Palabras clave:** Hidroxapatita biológica, mecanismo de formación, cálculo renal, válvula aórtica, fluido biológico

Pathologic mineralization is defined as the deposition of primarily phosphatic and calcium oxalate minerals from body fluids, including blood, plasma, interstitial fluid, urine and saliva, on undesired sites such as the aortic valve, kidneys, arteries and veins. Although the etiology of mineralization has been studied for nearly a century, not all aspects of this process are fully understood.

It is generally agreed that the formation and deposition of minerals from body fluids can occur only when the fluid is supersaturated with that mineral. As body fluids are frequently supersaturated, other conditions, such as deficiencies in specific inhibitors, the presence of nucleation substrates and abnormally high concentration of specific

ions, must also be present to facilitate the formation and deposition of minerals.

Heterogeneous nucleation of a solid on an appropriate substrate followed by classical crystallization route, i.e. incorporation of individual building units – ions - represents a commonly accepted concept formation and development of solid deposits. Arrival of ions to the binding site is governed by volume and/or surface diffusion. Crystals with well-developed habitus originate in a slightly supersaturated fluid, whereas shapeless, often amorphous, solids can be formed from highly supersaturated liquid. Calculations have shown, however, that the classical crystallization mechanism is highly questionable in the

case of hydroxyapatite (hereafter HAP), since the probability of incorporation of growth units into the bulk crystal is extremely low<sup>1</sup>.

A different mechanism of HAP crystal growth is based on the concept of pre-nucleation clusters that form in supersaturated solutions<sup>10</sup>. Specifically, Posner's clusters form in liquids supersaturated with respect to HAP<sup>1,2</sup>. The presence of these clusters with assumed composition  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  and about 1 nm in diameter was observed in a solution just saturated with HAP<sup>1,3</sup> and was recently confirmed experimentally in simulated body fluid<sup>4</sup>. According to this mechanism the growth of HAP crystals proceeds by direct incorporation of agglomerates of Posner's clusters, not individual ions, into the bulk crystal.

The formation of spherical HAP particles via Posner's clusters was experimentally found to proceed in 5 stages: **1)** coagulation of calcium phosphate clusters 1 nm in diameter into larger entities, **2)** accretion of these entities into agglomerates, **3)** formation of domains of closely associated agglomerates about 50 nm in diameter, **4)** transformation of domains into amorphous spherical particles about 150 nm in diameter, and **5)** formation of spherical objects with an average diameter of 10-30  $\mu\text{m}$  coexisting with remaining domains. This mechanism, specifically phases **3)** to **5)**, is active when suitable organic substrate is present<sup>5,6</sup>.

Amorphous matter can be gradually transformed into crystalline matter by solution-mediated or solid state aging. Solution-mediated transformation involves the slow dissolution of amorphous matter in a surrounding liquid and its gradual deposition onto a surface nucleus (nuclei). Thus, the transformation of a shapeless amorphous solid results in the formation of crystal(s) bounded

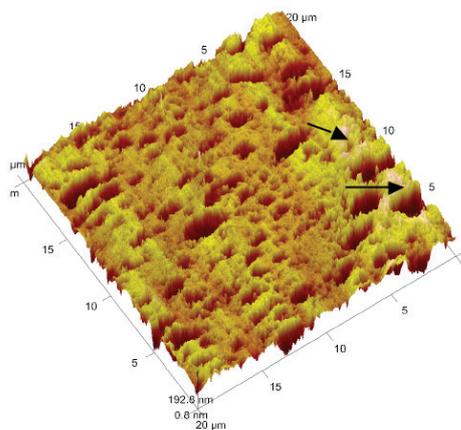
by flat faces, i.e. the habitus of newly formed crystals adopts a nearly or fully equilibrated shape. In contrast, solid state transformation proceeds through changes in the internal structure of a solid without contact with a liquid resulting in the formation of a crystalline lattice from amorphous matter without a change in the external shape of the particle, i.e. the original shape of particle remains unchanged.

Phosphate renal calculi are formed in the kidney cavity with poor urodynamics, i.e. in a cavity of the kidney in which the average residence time of largely stagnant urine substantially exceeds that of urine in the kidney pelvis. An adequate volume of urine is retained in this cavity. A phosphate calculus that forms in the kidney cavity is composed of a structureless compact phosphatic phase in the form of layers and blocks, abundant organic matter and large spherules disseminated throughout the calculus volume or occurring in large and often intergrown assemblies<sup>5,6</sup>. AFM showed that the compact phase consists of two distinctly different morphological forms of the phosphatic phase: a predominant phase consisting of spherical agglomerates with diameters up to 300 nm made up of spherulites of approximately 10 nm in diameter, and a less common phase consisting of separate and/or intergrown columnar crystals disseminated without any apparent order in the calculus interior **Figure 1, 2**<sup>7</sup>.

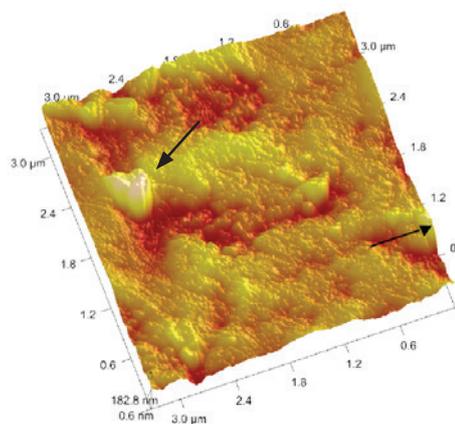
Solid concretions originating in 50 ml of stagnant simulated body fluid on a polymeric substrate situated on the bottom of an experimental vessel consisted of agglomerates 30 to 120 nm in diameter, but no crystals, **Figure 3**<sup>8</sup>. If the polymeric substrate had been positioned vertically, however, only a few hemispheres would have formed. The mechanical properties of the material forming the hemispheres were identical, indicating that the chemical compo-

**Figure 1:** AFM 3-D topographic image of the cross-section of the compact phase of the non-infectious phosphatic renal stone. Scan (a) 20 x 20  $\mu\text{m}$ , (b) 3.3 x 3.3  $\mu\text{m}$ . The red and yellow regions correspond to depressions, i.e. sites situated below the plane of the surface, and projections from the surface, respectively. Columnar crystals are indicated by arrows; surface is composed of agglomerates.

**Figure 1a**



**Figure 1b**



sition was uniform. The hemispheres were composed of amorphous material without any sign of crystallinity.

The structure of phosphate deposits formed in the human aortic valve differs from the structure of the urinary and synthetic concretions described above. The former deposits were formed by blocks of closely arranged elongated needle- and plate-like crystals and irregularly disseminated areas of soft organic material, **Figure 4**<sup>9</sup>. Any sporadically present large cavities containing small spherical objects were formed either by the irregular growth of individual blocks of the compact phosphatic phase or by intergrowth of two deposits developing in close vicinity.

These observations indicate that the structure of pathological deposits of calcium phosphate is influenced both by the volume of fluid from which the deposit forms and by the spatial orientation of the substrate on which the deposit forms.

In an adequate volume of body fluid in which uroliths and synthetic hemispheres form, the cluster mechanism predominates and the deposits are primarily composed of agglomerates of amorphous calcium phosphate. In contrast, aortic deposits originate in a confined space with their surface just wetted by a thin and nearly stagnant laminar layer of liquid. Although Posner's clusters must also be present in this layer of liquid, the spatial limitations restrict the formation of bigger agglomerates and the deposits grow via the classical crystallization route, i.e. by incorporation of building units, probably Posner's clusters, into the bulk of the deposit.

The spatial orientation of substrate also plays a role in deposit formation. If the substrate is oriented horizontally,

the number of particles arriving on the surface of substrate due to Brownian motion is augmented by settling of large agglomerates in the gravitational field. If the substrate is oriented vertically, then particles arrive on the surface only due to Brownian motion. Therefore, greater number of particles arrives on the surface of horizontally than on vertically oriented substrate in the same period of time.

The effect of settling on the deposit development can be estimated as follows:

The settling velocity of particles,  $v$ , in a stagnant liquid can be calculated from Stokes law if Reynolds number  $Re$  of the particle is less than 0.1

$$v = 2(\rho - \rho_0) r^2 g / 9 \eta_0 \quad (1)$$

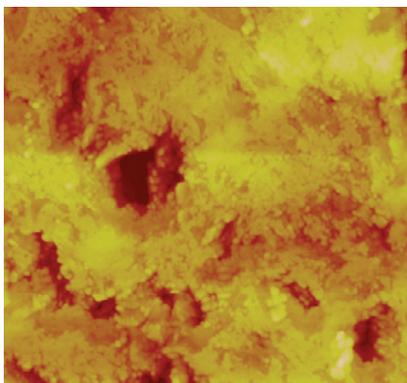
where  $\rho$  and  $\rho_0$  is the density of the particle and liquid respectively,  $r$  is the radius of the particle,  $g$  is the acceleration due to gravity and  $\eta_0$  is the dynamic viscosity of the liquid. Using values  $\rho = 3160 \text{ kg.m}^{-3}$ ,  $\rho_0 = 1020 \text{ kg.m}^{-3}$  (plasma density at 37°C<sup>12</sup>) and  $\eta_0 = 1.39 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$  (plasma viscosity at 37°C<sup>11</sup>),  $r = 5 \times 10^{-8} \text{ m}$ ,  $g = 9.81 \text{ m.s}^{-2}$  the settling velocity is  $8.4 \times 10^{-9} \text{ m.s}^{-1}$ , i.e.  $3.02 \times 10^{-5} \text{ m/hr}$ .

The particle Reynolds number for a sphere in a fluid is defined as

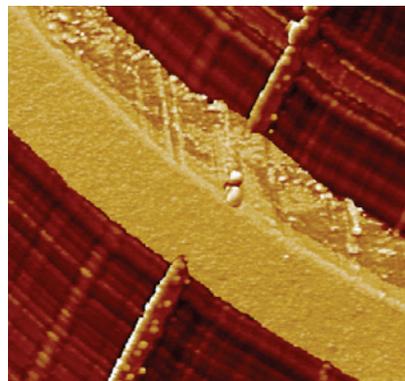
$$Re = \rho v L / \eta \quad (2)$$

where  $L$  is the characteristic dimension of the particle (diameter in case of sphere). For the cluster considered above  $Re = 9 \times 10^{-10}$ . Hence, eq. (1) is applicable in our case.

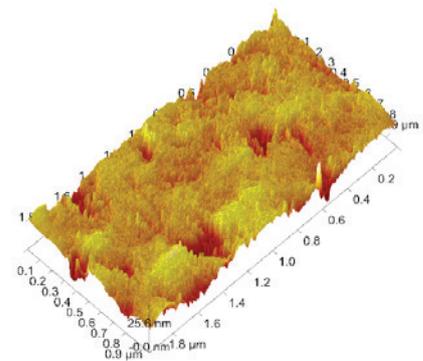
**Figure 2:** AFM nanoscale modulus map of the cross-section of the compact phase of the non-infectious phosphatic stone. Diameter of individual particles is about 10 nm. Red and yellow colours indicate sites composed of soft organic matter and stiff inorganic matter, respectively.



**Figure 3:** AFM 3-D topographic image of the cross-section of surface layer of synthetic hemisphere. Scan 8 x 8 μm. Light yellow colour indicates stiff material. This layer composed of agglomerates contains no crystals. Red parts of the image is organic matter in which synthetic hemisphere is fixed.



**Figure 4:** AFM 3-D topographic image of the cross-section of aortic valve deposit. Scan 1 x 2 μm. Attached needle- and plate-like crystals from the cross-section; agglomerates are not present.



The number of particles arriving on a substrate surface due to Brownian motion can be estimated from the mean displacement of particle in one direction  $\Delta x$  <sup>13</sup>

$$\Delta x = [(R T t) / (3 \pi N A r \eta_0)]^{1/2} \quad (3)$$

where R is the universal gas constant 8.31 J/K mol, T is temperature in K, t is time in seconds, NA is Avogadro's number  $6.022 \times 10^{23}$ /mol, r is the radius of particle in meters and  $\eta_0$  is the viscosity  $1.39 \times 10^{-3}$  Pa s. According to eq.(3), the mean displacement of aggregate 100 nm in diameter from eq. (3) is  $9 \times 10^{-5}$  m/hr.

Particles move due to Brownian motion in all directions. Assuming that movement occurs just in the directions of the Cartesian axes, then only one-sixth of the particles present would move towards the substrate. This is, one-sixth of the agglomerates of radius 50 nm present in a 90  $\mu\text{m}$  layer of stagnant liquid adjoining the substrate will reach its surface. When settling is also effective, then all agglomerates within 30  $\mu\text{m}$  from the surface and one-sixth of the particles present in the liquid layer located 30 to 90  $\mu\text{m}$  from the surface will reach the substrate. Thus, 2.5-fold more agglomerates of radius of 50 nm will

reach the surface of a horizontally situated substrate than a vertically situated surface during the same period of time. For agglomerates of radius 25 nm this difference is 1.3-fold.

The following mechanism of the formation of both types of concretions was hypothesized based on their ultra-fine structure: spherical agglomerates that formed via aggregation of Posner's clusters present in liquid, i.e. urine and simulated body fluid, after reaching a certain size gradually settled in the liquid and became incorporated into developing concretion. The columnar crystals irregularly disseminated in a phosphate calculus were nucleated on randomly distributed detritus of organic origin embedded in the compact phase. In both cases the settling of agglomerates onto concretions was found to be the principal mechanism of their formation from stagnant liquid in cavities of low urodynamic efficacy.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests

## References

1. Onuma K, Ito A. Cluster growth model for hydroxyapatite. *Chem Mater*. 1998; 10:3346-3351.
2. Posner AS, Betts F. Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure. *Acc Chem Res* 1975; 8:273-281.
3. Oyane A, Onuma K, Kokubo T, Ito A. Clustering of calcium phosphate in the system  $\text{CaCl}_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KCl-H}_2\text{O}$ . *J Phys Chem B* 1999; 15:6557-6562.
4. Dey A, Bomans PHH, Muller F, Will J, Frederik PM, de With G, Somerdijk AJM. The role of prenucleation clusters in surface-induced calcium phosphate crystallization. *Nature Materials*. 2010; 9: 1010-1014.
5. Grases F, Costa-Bauzá A, Prieto RM, Gomila I, Pieras E, Söhnel O. Non-infectious phosphate renal calculi: Fine structure, chemical and phase composition. *Scand J Clin Lab Invest*. 2011;00:1-6.
6. Grases F, Söhnel O, Vilacampa AI, March JG. Phosphates precipitating from artificial urine and fine structure of phosphate renal calculi. *Clin Chim Acta*. 1996; 244: 45-67.
7. Zelenková M, Söhnel O, Grases F. Ultrafine structure of the hydroxyapatite amorphous phase in non-infectious phosphate renal calculi. *Urology* 2012, 79(4) 968.e1-6.
8. Grases F, Zelenková M, Söhnel O. Structure and formation of calcium phosphate concretions formed in simulated body fluid. *Urolithiasis* 2014, (42): 9-16.
9. Grases F, Söhnel O, Zelenková M. Ultrafine structure of human aortic valve calcific deposits. *J Citol Histol*. 2014, (5) 214, doi:10.4172/2157-7099.1000214.
10. Mullin JW, Leci CL. Evidence of molecular cluster formation in supersaturated solutions of citric acid. *Philosophical Magazine* 1969, 19(161):1075-77.
11. Rosenson RS, McCormick A, Uretz EF. Distribution of blood viscosity values and biochemical correlates in healthy adults. *Clinical Chem*. 1996, 42(8):1189-1195.
12. Trudnowski RJ, Rico RC. Specific Gravity of Blood and Plasma at 4 and 37 °C. *Clinical Chem*. 1994, 20(5):615-616.

## ESTUDI DE CASOS

## Caso clinicopatológico: varón joven con disminución del nivel de conciencia y consumo reciente de cocaína

*Clinico-pathologic case: young male with low level of consciousness and recent cocaine abuse*

**M<sup>a</sup> Dolores Moragues Benito<sup>1</sup>, Bartomeu Colom Oliver<sup>2</sup>, Mireia Illueca Moreno<sup>3</sup>, Carmen Jiménez Martínez<sup>1</sup>, Marta Couce Matovelle<sup>2</sup>, Manuel del Río Vizoso<sup>4</sup>**

*1 Servicios de Neurología, 2 Anatomía Patológica, 3 Neurocirugía y 4 Hospitalización a Domicilio  
H. U. Son Espases. Palma de Mallorca. Illes Balears*

### Correspondencia

Manuel del Río Vizoso

Unidad de Hospitalización a Domicilio, Planta 0, módulo F.

Hospital Universitario Son Espases.

Carretera de Valldemossa, 79

07010 Palma de Mallorca.

**Recibido:** 3 – XI – 2014

**Aceptado:** 9 – XIII – 2014

**doi:** 10.3306/MEDICINABALEAR.30.01.47

### Resumen

Varón de 43 años, consumidor habitual de cocaína, que habiendo sido encontrado en su domicilio con bajo nivel de conciencia es remitido a nuestro hospital. Se le practica TAC craneal que muestra hematomas lobar izquierdo y subdural interhemisférico, así como infarto isquémico frontoparietal izquierdo, siendo intervenido a continuación para evacuación del hematoma. La evolución inicial es tórpida en UCI, con diversas infecciones pulmonares bacterianas. Pasa a planta convencional de forma estable al 21 día del ingreso. El día 30 del ingreso presenta muerte súbita.

### Abstract

This is the case of a 43 years old male, cocaine user, found at home with low level of consciousness and admitted to our hospital. A brain CT was performed, founding parenchymal and subdural hematoma and ischemic left stroke, undergoing brain surgery. He had a torpid evolution at the ICU, with several bacterial lung infections, and went to the neurosurgical unit after 21 days. He died suddenly, with no previous symptoms, at the 30<sup>th</sup> day of admission.

### Caso clínico

Varón de 43 años, con antecedentes de tabaquismo, consumidor de cocaína, asma leve intermitente, obeso y con perforación de tabique nasal, que fue recogido en su domicilio por el equipo de emergencias 061 al presentar deterioro neurológico súbito hasta GCS 10.

Durante el traslado, sufre nuevo deterioro a GCS 6, requiriendo intubación. A su llegada al hospital presenta temperatura de 39.4°C, con una exploración anodina del resto de sistemas.

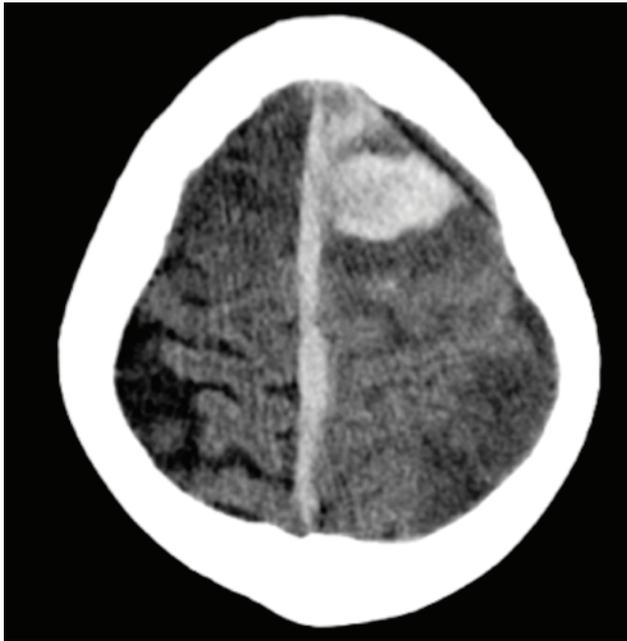
En cuanto a las pruebas complementarias realizadas a su llegada, destaca una alteración de la coagulación (TP 62%, INR 1.4) y ausencia de leucocitosis; gasometría, electrocardiograma y radiografía de tórax normales y sedimento positivo para cocaína y benzodicepinas.

Se realizó TAC craneal urgente (**Imagen 1**), que mostró hematoma lobar frontal izquierdo de 5 cc y hematoma

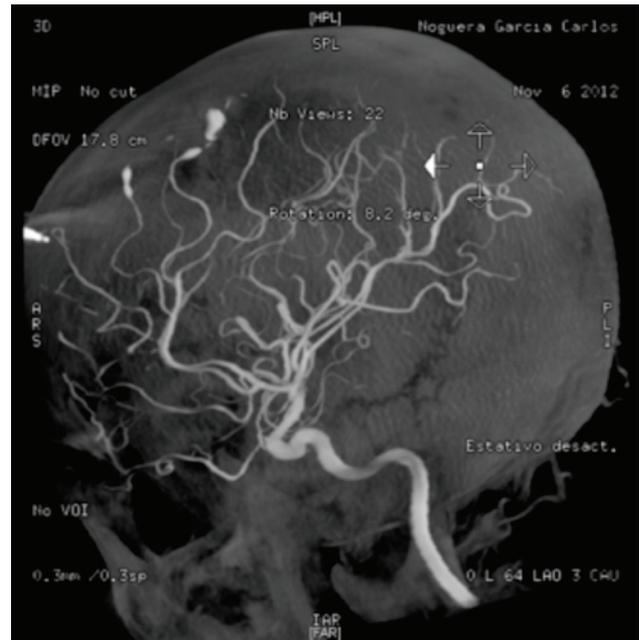
subdural agudo interhemisférico con extensión al tentorio izquierdo, así como infarto fronto-parietal izquierdo establecido con otras lesiones isquémicas parcheadas. Ante la sospecha de lesión subyacente al hematoma lobar, se realiza arteriografía urgente (**Imagen 2**), que objetiva lesiones compatibles con pseudoaneurismas en ramas terminales dependientes de la arteria caloso-marginal izquierda. Durante el procedimiento endovascular, se produce una extravasación de contraste con hipertensión intracraneal y se interviene urgentemente al paciente para evacuación del hematoma y clipaje de los pseudoaneurismas.

Durante su ingreso en UCI, presentó varios cultivos de BAS positivos, resolviéndose las infecciones satisfactoriamente. Se objetivaron también petequias en tronco y extremidades superiores, que desaparecían a la vitropresión, siendo orientadas como foliculitis por dermatología. Se realizó ecocardiograma transtóraco para descartar vegetaciones/endocarditis, en el que no se observaron

**Imagen 1.** TAC craneal en el que se aprecian el hematoma lobar, el subdural internemisférico y la lesión isquémica parietal izqda.



**Imagen 2.** Reconstrucción 3D de arteriografía cerebral en la que se objetivan lesiones sugestivas de pseudoaneurismas.



hallazgos reseñables. Las serologías fueron positivas únicamente para VHB con antiHBc.

El día 21 del ingreso, fue dado de alta a planta en GCS 11 puntos con traqueostomía, hemiplejía derecha, afebril y estable. El día 9 del ingreso en planta falleció súbitamente sin causa aparente.

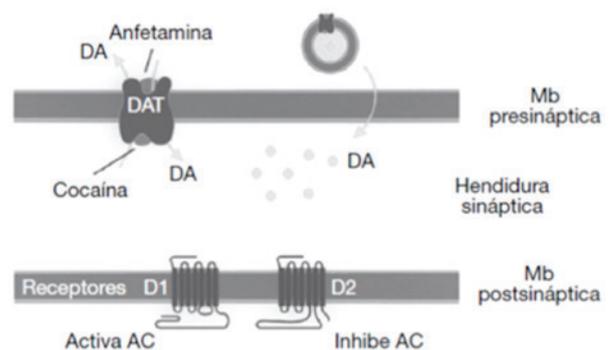
## Discusión

La cocaína es la droga más frecuentemente implicada en la enfermedad cerebrovascular de pacientes jóvenes menores de 55 años. Se considera un factor de riesgo independiente tanto para sufrir eventos isquémicos como hemorrágicos, con independencia de la frecuencia o duración del consumo<sup>1</sup>. Supone un aumento del riesgo relativo 6.5 veces más de padecer ictus que la población general. Este riesgo aumenta si tenemos en cuenta la frecuente comorbilidad asociada, principalmente con el consumo de tabaco y alcohol. Junto con el alcohol, la cocaína forma un metabolito conocido como cocaetileno que potencia el efecto de ambas drogas<sup>2,3</sup>. La cocaína actúa a nivel del sistema nervioso central (**Figura 1**) como una amina simpático-mimética de acción indirecta al unirse al transportador recaptador de aminas y bloquear la recaptación presináptica de noradrenalina, dopamina y serotonina. Esto se traduce en un exceso de neurotransmisores en la hendidura sináptica y la activación del sistema nervioso simpático, siendo el responsable de la aparición de la mayoría de los síntomas durante el consumo (vasoconstricción, hipertensión, taquicardia, sudoración...)<sup>4</sup>.

Se han descrito múltiples mecanismos fisiopatológicos implicados en el ictus hemorrágico asociado al consumo de cocaína: la patología vascular subyacente (rotura de aneurismas o malformaciones arteriovenosas), hematomas hipertensivos, reperfusión del tejido isquémico (por resolución de la vasoconstricción o recanalización tras la disolución de un trombo), endocarditis infecciosa y embolia séptica y, menos frecuente, la vasculitis<sup>5-7</sup>.

En el caso que nos ocupa, tenemos un paciente joven con consumo reciente de cocaína que presenta un ictus hemorrágico intraparenquimatoso con componente subdural agudo, así como lesiones isquémicas en distintos territorios, objetivándose en la angiografía pseudoaneurismas y dilataciones fusiformes de ramas corticales de la arteria cerebral anterior (ACA).

**Figura 1:** Representación esquemática del mecanismo de acción de la cocaína. DAT: transportador de dopamina; AC: adenilatoclasa; DA: dopamina; Mb: membrana.



Se plantean en este caso dos hipótesis diagnósticas basándonos en los hallazgos del TC craneal y la angiografía cerebral.

La primera hipótesis diagnóstica es que se trate de aneurismas micóticos. El hematoma intraparenquimatoso frontal se explicaría por la rotura del aneurisma a nivel de la ACA. Además, se sabe que los aneurismas de ramas terminales de la ACA presentan mayor facilidad para producir hemorragias en el espacio subdural<sup>9</sup>. Las lesiones isquémicas en los distintos territorios se podrían justificar por varios mecanismos: vasoespasmos secundario al consumo de cocaína, componente de hemorragia subaracnoidea (no detectado en TC craneal) o bien, la suelta de émbolos cardíacos secundarios a endocarditis. Se ha descrito que hasta un 1-3% de las endocarditis en consumidores de cocaína se manifiestan en forma de ictus hemorrágico por rotura de émbolos sépticos. Por otra parte, los aneurismas micóticos se han relacionado principalmente con la presencia de septicemia en pacientes con endocarditis infecciosa y/o consumo de drogas por vía parenteral<sup>9</sup>. Ante un paciente con signos clínicos de endocarditis o septicemia con hemocultivos positivos debemos sospechar la posibilidad de un aneurisma micótico cuando en la angiografía observamos una colección de contraste adyacente a un vaso cerebral (distal al polígono de Willis), con cambios morfológicos en un período corto de tiempo y que presenta retención y lavado tardío. Hasta un 25% de estos aneurismas son múltiples, con una mortalidad del 80% cuando se asocian a rotura<sup>10</sup>. En el caso de nuestro paciente únicamente se cumplen tres criterios menores de Duke (fiebre  $\geq 38^{\circ}\text{C}$ , hemorragia intracraneal y la posibilidad de aneurismas micóticos). Sin embargo, no disponemos de un estudio más completo como una ecografía transesofágica que permita detectar vegetaciones  $< 2\text{mm}$  y abscesos perivalvulares, un estudio microbiológico más amplio que incluya determinación de *Coxiella*, hongos o microorganismos del grupo HACEK, ni tampoco de un fondo de ojo. Basándonos en los hallazgos radiológicos consideramos probable la posibilidad de que se tratará de un ictus hemorrágico por émbolo séptico. Sin embargo, basándonos en los datos clínicos (no consumo de drogas por vía parenteral, no cardiopatía previa) y el resto de pruebas complementarias (hemocultivos seriados negativos y ecocardiograma transtorácico normal) consideramos como poco probable dicha posibilidad.

La segunda posibilidad diagnóstica que se plantea ante la presencia de irregularidades de la luz arterial con dilataciones fusiformes y pseudoaneurismas es que se trate de una vasculitis del SNC. Los mecanismos fisiopatológicos implicados van a ser fundamentalmente inmunológicos, siendo menos frecuente la acción directa de agentes infecciosos o células tumorales. Sin embargo, la vasculitis inducida por consumo de cocaína es un mecanismo poco frecuente y desconocido, habiéndose postulado dos hipótesis, bien que se trate de una vasculopatía inflamatoria real o bien, de una vasculopatía inducida por

una reacción inusual<sup>11,12</sup>. En cualquier caso, es importante siempre realizar un diagnóstico de exclusión con otras causas de vasculitis sistémicas (primarias o secundarias). Para ello es imprescindible un estudio inmunológico y microbiológico completo, incluyendo el análisis del líquido cefalorraquídeo, pruebas complementarias de las que no disponemos, así como tampoco de la biopsia de las lesiones cutáneas que presentó el paciente durante el ingreso. En la angiografía es característica la presencia de áreas multifocales de estenosis de forma lisa o irregular que alternan con segmentos dilatados, lo que justificaría las lesiones que presenta nuestro paciente: isquemia en distintos territorios arteriales por estenosis multifocales y lesión hemorrágica por rotura de dilatación aneurismática. Por todo ello, consideramos como probable la posibilidad de una vasculitis del SNC inducida por consumo de cocaína sin poder excluir otras posibilidades diagnósticas como, la vasculitis sistémica de causa infecciosa (fiebre y leucocitosis con neutrofilia al ingreso) y, menos probable las vasculitis secundarias a enfermedades de colágeno o las vasculitis primarias.

Como posibilidades diagnósticas en nuestro paciente se apuntan las siguientes:

Vasculitis con afectación del SNC	Secundarias	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Consumo de cocaína</li> <li>• Infecciones</li> <li>• Enfermedades de colágeno</li> <li>• Tumorales</li> </ul>
	Primarias	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medianos o pequeño vaso</li> </ul>
Aneurismas micóticos por émbolo séptico		

## Estudio anatomopatológico

En la biopsia, los fragmentos remitidos mostraron un infiltrado inflamatorio neutrofílico severo localizado principalmente en meninges, con extensión parenquimatosa. Los vasos arteriales presentaban una vasculitis severa con presencia de áreas de necrosis fibrinoide en su pared (**Fotos 1, 2 y 3**). No se observaron granulomas, depósitos de amiloide ni microorganismos. En los fragmentos de tejido cerebral remitido no se observaban áreas de hemorragia.

En la autopsia, el encéfalo pesaba en fresco 1415 g, y a la apertura de la cavidad craneal destacaron como hallazgos, unas leptomeninges engrosadas, con la duramadre recubierta por un área fibrino-hemorrágica de 9x6 cm frontotemporal izquierda, junto con una colección de aspecto purulento, blanco-verdoso, observables a nivel subaracnoideo frontoparietal derecho y parietooccipital izquierdo (**Foto 4**). A este nivel el estudio histológico demostró lesiones similares a la descritas en la biopsia previa, si bien con un menor grado de inflamación a nivel vascular.

Foto 1

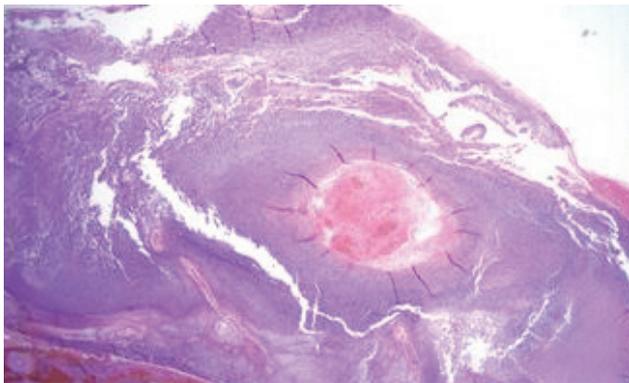


Foto 2

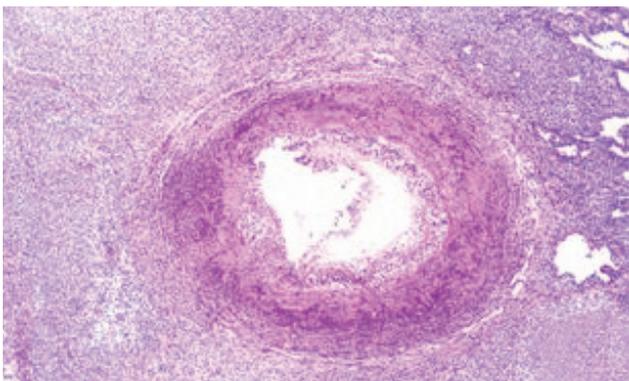
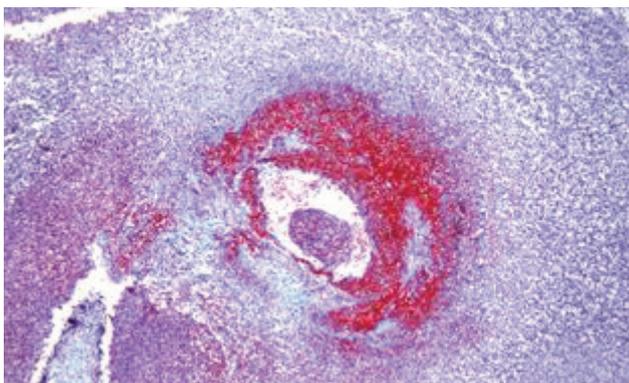


Foto 3



En la biopsia, los fragmentos remitidos mostraron un infiltrado inflamatorio neutrofilico severo localizado principalmente en meninges (1), con extensión parenquimatoso. Las arterias presentaban una vasculitis severa (2) con presencia de áreas de necrosis fibrinoide en su pared (3) (Tricrómico de Masson)

Se observaba además un hematoma intraparenquimatoso frontotemporal izquierdo de 3 cm con reblandecimiento perilesional, con cambios histológicos de tipo subagudo propios de las lesiones vasculares. (Foto 5)

Los hemisferios se mostraban edematosos, sin observarse herniaciones. Los senos sagitales no mostraron anomalías. No se observaron anomalías vasculares ni otras alteraciones en el examen neuropatológico. Los cultivos microbiológicos de muestras obtenidas resultaron negativos. Con las técnicas de histoquímica habituales (PAS, Gram, Grocott), no se objetivaron microorganismos.

Foto 4

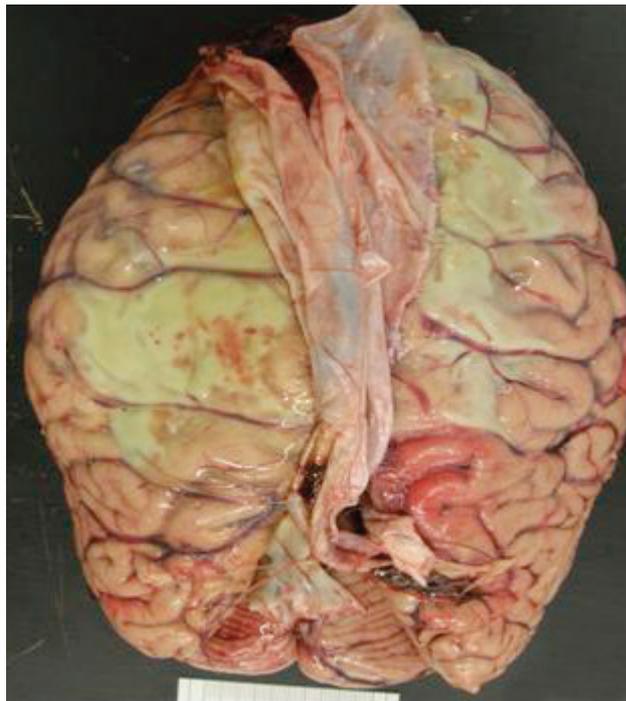
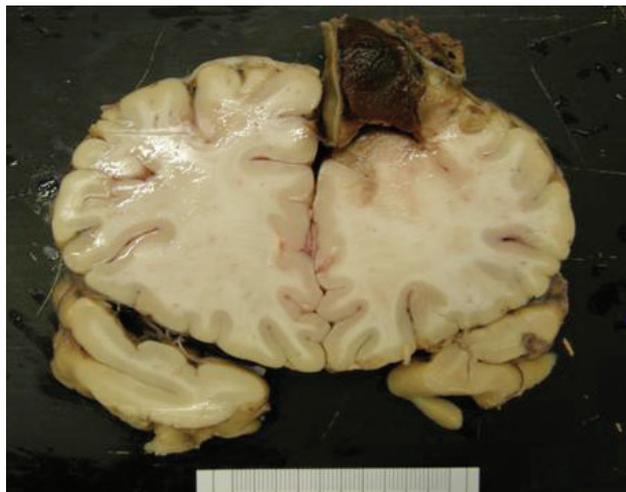


Foto 5



El cerebro mostraba una colección de aspecto purulento, blanco-verdoso, a nivel subaracnoideo frontoparietal derecho y parietooccipital izquierdo (4), y hematoma intraparenquimatoso frontotemporal izquierdo (5).

En el resto del estudio necrópsico no se objetivaron otros focos de vasculitis ni otros hallazgos destacables.

Las particularidades propias de la lesión, una meningoencefalitis aguda con vasculitis neutrofilica, con cultivos de tejido, LCR y técnicas de histoquímica que no evidencian microorganismos, no favorecen un origen infeccioso.

Su localización exclusiva en SNC (y de forma focal), con afectación de pequeño y mediano vaso, no linfocitaria y sin acompañarse de granulomas, y sin afectación clínica periférica, son hallazgos que no acompañan los usualmente

presentes en una vasculitis primaria de SNC ni los descritos como propios de las patologías sistémicas autoinmunes con afectación de SNC (PAN, PAM) o los asociados a otras patologías sistémicas como la diabetes<sup>13, 14, 15, 16</sup>

El dato objetivo en la historia del paciente de consumo de cocaína previo permite orientar ya la biopsia como una meningoencefalitis aguda con vasculitis neutrofílica, indicando en una nota aparte que estos hallazgos podían ser compatibles con aquellos descritos en la literatura como vasculitis central inducida por cocaína, vinculado a meningitis neutrofílica, sin presencia de patógenos.

El hallazgo de una vasculitis central inducida por cocaína no es usual. En la literatura existen escasos casos con el estudio histológico realizado, y hay variabilidad en la descripción de las lesiones vasculares inducidas por consumo de cocaína<sup>17, 18</sup> que parecería relacionarse con su vía de administración<sup>19, 20</sup>. La necrosis fibrinoide con infiltrado polimorfonuclear en vasos parece asociada más con casos de uso de la vía inhalada, abuso de anfetaminas y presencia de un antihelmíntico (levamisol) en el corte de la droga, la meningitis neutrofílica asociada ha sido descrita previamente en algunos casos aislados.

## Bibliografía

1. Larrosa-Campo D, Ramón-Carbajo C, et al. Diagnóstico del ictus por cocaína y sus complicaciones. *Rev Neurol* 2013; 57 (4): 167-170.
2. Raul Pastor D, Llopis J.J, Abel Baquero D. Interacciones y consecuencias del consumo combinado de alcohol y cocaína: una actualización sobre el cocaetileno. *Rev Adicciones* 2003; 15 (2): 159-164.
3. Carcelén-Gadea M.E, et al. Implicación de la cocaína en la patología vascular cerebral. *Rev Neurol* 2012; 54 (11): 664-672.
4. Moratalla R. Neurobiología de la cocaína. *Trastornos adictivos* 2008; 10 (3): 143-150.
5. Blanco M, Díez-Tejedor E, Vivancos F, Barreiro P. Cocaína y enfermedad cerebrovascular en adultos jóvenes. *Rev Neurol* 1999; 29 (9): 796-800.
6. Kibayashi K, Matri A, Hirsch C. Cocaine induced intracerebral hemorrhage: analysis of predisposing factors and mechanisms causing hemorrhagic strokes. *Human Pathology* 1995; 26 (6): 659-663.
7. Treadwell S, Robinson T. Cocaine use and Stroke. *Postgrad Med J* 2007; 83: 389-394.
8. Saleh T, Badshah A, Afzal K. Spontaneous acute subdural hematoma secondary to cocaine abuse. *South Med J* 2010; 103 (7): 714-715.
9. Ducruet A, Hickman Z, Zacharia B, et al. Intracranial infectious aneurysms: a comprehensive review. *Neurosurg* 2010; 33: 37-46.
10. Quitana Murias E, et al. Nuestra experiencia en el diagnóstico y tratamiento de los pseudoaneurismas cerebrales. *Radiología* 2012; 54(1); 65-72.
11. Fredericks RK, et al. Cerebral vasculitis associated with cocaine abuse. *Stroke* 1991; 22(11): 1437-1439.
12. Lester J, et al. Vasculitis cerebral asociada a drogas. *Rev Neurol* 2005; 40 (12): 736-738.
13. Jennette JC et al. 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. Special Article. *Arthritis & Rheumatism* 2013; 65 (1): 1-11
14. Berlitt P. Diagnosis and treatment of cerebral vasculitis. *Ther Adv Neurol Disord* 2010; 3(1): 29-42
15. Younger D. Vasculitis of the nervous system. *Curr Opin Neurol* 2004; 17:317-336
16. Giang DW. Central Nervous System Vasculitis Secondary to Infections, Toxins and Neoplasms. *Seminars in Neurology* 1994; 14(4): 313-319
17. Case Records of the Massachusetts General Hospital: Weekly Clinicopathological Exercises. Case 27-1993. *N Eng J Med* 1993; 329 (2): 117-124
18. Díez-Tejedor E, Frank A, Gutiérrez M, Barreiro P. Encefalopathy and biopsy-proven cerebrovascular inflammatory changes in a cocaine abuser. Case report. *European Journal of Neurology* 1998; 5: 103-107
19. Friedman D. R. Cocaine-Induced Pseudovasculitis. Case Report. *Mayo Clin Proc*. May 2005;80(5):671-673
20. Merkel PA, Koroshetz WJ, Irizarry MC, Cudkovic ME. Cocaine-Associated Cerebral Vasculitis *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 1995; 12(3): 172-183

## Procesos tóxicos ambientales de los metales pesados y metaloides en poblaciones humanas

de Miguel Capó Martí, José María Delgado Mateo, María José Anadón Baselga, María Teresa Frejo Moya, María del Carmen Sandoval Bartolomé

Ricardo Andrés Roa-Castellanos

Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

Los metales pesados, los metaloides, y sus efectos sobre la salud pública, son hoy un importante tema con impactos poblacionales de variable intensidad, si bien tales partículas poseen ya efectos globalizados, incluso a nivel mediático. Múltiples hallazgos científicos, pero también los perjudiciales discursos pseudocientíficos, como los de los movimientos anti-vacunas, gravitan alrededor de estas sustancias. De ahí que la mejor y más válida interlocución sea la proferida por la discreta rama de la medicina conocida como toxicología. Esta obra multidisciplinaria de la medicina, producto del trabajo conjunto entre la medicina humana y veterinaria para la especialidad conjunta de la toxicología, da cuenta de ello.

Los metales pesados, es decir, los elementos con peso específico superior a 5 gramos/cm<sup>3</sup>, son protagonistas de episodios que han retado la salud tras episodios cada vez más frecuentes desde la puesta en marcha de la Revolución Industrial. El libro muestra como este objeto de estudio ha trascendido las fronteras de la *toxicología clínica e industrial* hasta abarcar los complejos campos de la recientemente creada *ecotoxicología*.

Varios de los hitos epidemiológicos -que dieron forma, en el siglo XX, a la profundización de estos procesos patológicos-, demostraron la crónica y acumulativa afectación de estos elementos sobre diferentes sistemas y aparatos orgánicos. La revolución industrial posibilitó no sólo logros técnicos sino también la producción y vertimiento de este tipo de partículas al aire, a las aguas, a otras especies utilitarias, y a ambientes laborales de diversos tipos. Arsénico, plomo, cadmio y mercurio cobraron nuevos significados para la vida humana, por ejemplo.

En la actualidad el auge de la minería, la fabricación y combustión de materias primas fósiles, la ingesta de alimentos tenidos por saludables como el pescado o el agua (p: 13), o el uso de pinturas con plomo, de acuerdo con los autores, ha incrementado en unas 300 veces la concentración de este último metal en el cuerpo de un adulto actual en comparación con nuestros antepasados (p: 17).

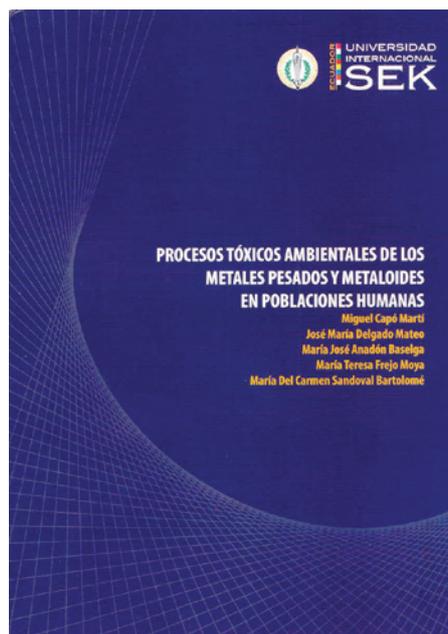
La redistribución artificial, o antropogénica, descrita para estos metales, implica desde dragados de los ríos, la quema de maderas intencionales para generación energética, o accidentales como en los incendios y su participación en procesos productivos de electrodomésticos, aparatos electrónicos, o agro-químicos (p: 27). Múltiples vertimientos resultan depositándose como cationes metálicos en el fondo de ríos o mares, alterando hábitats, condiciones físico-químicas de aguas y ecosistemas e integrando seres vivos, que son consumidos como materia prima. La cadena trófica aumenta así la exposición de los seres humanos a sustancias que pasan a ser "tóxicos", según el elevado nivel de la dosis a la cual un individuo es

sometido (p: 51). La contundente observación clásica de Paracelso, en el sentido venenoso que puede adoptar cualquier sustancia, es notoriamente manifiesta con este grupo de elementos inertes.

La segunda parte del libro explicará de manera sencilla los mecanismos patogénicos de los iones metálicos en humanos y animales. La alta mortalidad, disminución en crecimiento, reducción de las tasas reproductivas, inmunotoxicidad, o inactivación enzimática son discriminadas en sus acciones sobre *sub-phylum*, varias clases, órdenes de animales e inclusive repertorios celulares humanos específicos (p: 61-95). El ilustrativo libro cerrará con un apartado sobre alternativas de *detoxificación* una vez explicadas las fases de *bioacumulación* y *biomagnificación*, en sus escalas orgánica, sistémica, o de distribución de los metales de acuerdo a los variados órganos

diana que tiene cada metal pesado. De interés, los autores notan como el acumulo varía entre especies señalando los casos contrastantes de lombrices, insectos, mariscos, etc. Allí cada uno representa un filtro distinto que puede atrapar los tóxicos metálicos al punto de hacer parecer el agua sin presencia de contaminantes mientras la flora y fauna están saturadas de los mismos (p: 114).

Para interés de funcionarios e investigadores de las ciencias de la salud, la sección final indica metodologías para muestreos, además de un *Anexo legislativo* en el nuevo y viejo continente, representados por leyes de España y Ecuador respectivamente.



# TARJETA EXCLUSIVE

Disfruta de las ventajas de la primera tarjeta "Etiqueta Negra".



Te presentamos la nueva tarjeta **Exclusive de Banca March**, una tarjeta diseñada especialmente para nuestros clientes más exclusivos.

Disfruta de un **excepcional abanico de servicios y descuentos exclusivos**: servicio de reservas, descuentos en spas, balnearios y campos de golf, plan de protección de tarjetas y de teléfono móvil, seguro de asistencia en viajes con las coberturas más amplias del mercado, seguro de accidentes de 1 millón de euros y un largo etcétera, que sitúan al más alto nivel a la tarjeta Exclusive y a su titular.

Infórmate en nuestras oficinas, en [www.bancamarch.es](http://www.bancamarch.es) o llamando al teléfono **901 111 000**

Más  
de **80 años**  
a tu servicio

**TRADICIÓN  
DE FUTURO**

 **BANCA MARCH**



www.ramib.org

## Junta Directiva de la Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears

---

<b>President</b>	Macià Tomàs Salvà
<b>Vicepresident</b>	Fèlix Grases Freixedas
<b>Secretari General</b>	Antonio Cañellas Trobat
<b>Vicesecretari</b>	Josep F. Forteza Albertí
<b>Tresorer</b>	Joan Besalduch Vidal
<b>Bibliotecari</b>	Ferran Tolosa Cabani

## Acadèmics d'honor

---

2003 -	Excm. Sr. Santiago Grisolia García, Premi Príncep d'Astúries
2007 -	Excm. Sr. Ciril Rozman, Premi Jaime I

## Acadèmics numeraris

---

M.I. Sr. Miguel Munar Qués  
M.I. Sra. Juana Ma Román Piñana  
M.I. Sr. José Tomás Monserrat  
M.I. Sr. Guillermo Mateu Mateu  
M.I. Sr. Arnaldo Casellas Bernat  
M.I. Sr. José Miró Nicolau  
M.I. Sr. Bartolomé Anguera Sansó  
M.I. Sr. Bartolomé Nadal Moncadas  
M.I. Sr. Alfonso Ballesteros Fernández  
M.I. Sr. Francesc Bujosa Homar  
M.I. Sr. Ferran Tolosa Cabani  
Excm. Sr. Macià Tomàs Salvà  
M.I. Sr. Alvaro Agustí García-Navarro  
M.I. Sra. Juana Ma Sureda Trujillo  
M.I. Sr. Juan Buades Reinés  
M.I. Sr. José L. Olea Vallejo  
M.I. Sr. Pere Riutord Sbert  
M.I. Sr. Joan Besalduch Vidal  
M.I. Sr. Fèlix Grases Freixedas  
M.I. Sr. Antonio Cañellas Trobat  
M.I. Sra. Marta Couce Matovelle  
M.I. Sr. Josep F. Forteza Albertí  
M.I. Sr. Jordi Ibáñez Juvé  
M.I. Sr. Joan March Noguera  
M.I. Sr. A. Arturo López González

## Protectors de la Reial Acadèmia

---

Banca March  
Col·legi Oficial de Metges de les Illes Balears  
ASISA

## Benefactors de la Reial Acadèmia

---

D. Manuel Cifré Ramos  
Consell de Mallorca  
Salut i Força

## Patrocinadors de la Reial Acadèmia

---

Clinica Rotger  
Fundación MAPFRE  
Médicos Rosselló  
TIRME  
USP. Clínica Palmaplanas



# MEDICINA · BALEAR

PUBLICACIÓ DE LA REIAL ACADEMIA DE MEDICINA DE LES ILLES BALEARS

[www.medicinabaleaer.org](http://www.medicinabaleaer.org)