

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

**CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN
PROOPIOMELANOCORTINA (POMC) EN
LINFOCITOS PERIFÉRICOS DE PACIENTES
SOMETIDOS A CIRUGÍA, BAJO ANESTESIA
INTRADURAL.**

Memoria presentada por la licenciada

M^a DEL PILAR CUESTAS RUIZ DE TEMIÑO

Para acceder al título de Doctor en Medicina

Directores de tesis: ANTONIO MONTERO MATAMALA
CARLOS HERVÁS PUYAL
MANUEL ARMENGOL CARRASCO

Hospital Valle de Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona

BARCELONA, año 2008

A la memoria de mi madre

Agradecimientos

Agradecimientos

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a todos aquellos que, de una u otra forma, han contribuido a la realización de esta investigación:

Al Profesor Antonio Montero Matamala, Jefe de Servicio de Anestesia, Reanimación y Terapéutica del Dolor del Hospital Arnau de Vilanova y director de la presente Tesis, por permitirme trabajar bajo su dirección, por su constante ayuda, apoyo y orientación científica desde los inicios.

A Félix Rueda, investigador senior de Departamento de Genética Molecular (IDIBELL) Hospital Duran i Reynals HUB, sin quien no hubiese podido llevar a cabo este trabajo, por ayudarme a abrir una nueva línea de investigación en el campo de las variaciones genéticas en relación al estrés perioperatorio.

Al Dr. Carlos Hervás Puyal y al Dr. Manuel Armengol Carrasco, por su apoyo en la dirección de la Tesis.

A los Doctores: Carlos Martín Justos, Vinyet López Reig, Cristina Cilla Revenga y José Manuel Souto Ferro, por su ayuda desinteresada en este estudio, por su cariño y amistad.

A la Dra. Cristina Masuet del Departamento de Medicina Preventiva del Hospital de Bellvitge, por su amable y valiosa colaboración en el análisis estadístico de los resultados.

A todos los compañeros del Servicio de Anestesia, Reanimación y Terapéutica del dolor del Hospital de Bellvitge, y en especial a la memoria del Dr. Juan Irujo, por su colaboración y camaradería.

A la Dra. Elena Castellanos Hernández, por su amistad y por escucharme siempre.

A Catherine Ann Jones, por su amor, entrega e ilusión que ha hecho posible que llegara hasta aquí.

A Luna y Fredy.

ABREVIATURAS

- **ACTH** : Adrenocorticotropina u hormona adrenocorticotropa.
- **ADN** : Ac. Desoxiribonucleico.
- **AE**: Aminoácidos Excitadores.
- **ak**: ácido kaínico.
- **AMPA**: Alfa-amino 3hidroxy 5methylisoxazolen 4propionico Acid.
- **ARN**: Ac. Ribonucleico.
- **ASA**: American Society Anaesthesiology.
- **bp**: base pairs, pares de bases.
- **CMN**: Células Mononucleadas.
- **CRF**: Factor liberador de corticotropina.
- **DE**: Desviación Estándar.
- **DEPC**: Diethylene Pyrocarbonate
- **DNA**: Desoxiribonucleic Acid.
- **DHS**: Dinamic Hip Screw, tornillo dinámico de cadera.
- **ECG**: Electrocardiograma.
- **EVA**: Escala Visual Analógica.
- **CRF**: Factor liberador de hormona corticotropa.
- **ME**: Medula Espinal.
- **MSH**: Melanocyte Stimulating Hormona, hormona estimulante de melanocitos.
- **NK1**: Neuroquinina 1.
- **NMDA**: N- metil- D- Aspartato.
- **PBS**: Phosphate Buffers Saline.
- **PCR**: Polymerase Chain Reaction.
- **POMC**: Proopiomelanocortina.
- **rpm**: revolutions per minute, revoluciones por minuto.
- **PTC**: Prótesis Total de Cadera.
- **PTR**: Prótesis Total de Rodilla.
- **PVC**: Presión Venosa Central.
- **RNA**: Ribonucleic Acid.
- **RNA_m**: Ribonucleic Acid Messenger.
- **RT-PCR**: Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction.
- **SD**: Standard Deviation.
- **SDS**: Sodio Diacetil Sulfato.
- **SNC**: Sistema Nervioso Central.
- **SP**: Sustancia P.
- **THA**: Total Hip Arthroplasty.
- **TKA**: Total Knee Arthroplasty.
- **VAS**: Visual Analogue Scale.

Índice general

I. INTRODUCCIÓN.....	
I.1. RESPUESTA INMUNO- METABOLICA AL ESTRÉS QUIRURGICO.....	10
I.2. PROOPIOMELANOCORTINA. (POMC).....	13
I.3. OPIOIDES SISTEMICOS E INTRATECALES.....	14
I.4. HISTORIA DEL PROYECTO.....	18
II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	23
II.1. OBJETIVOS.....	24
III. PACIENTES	
III.1. SELECCIÓN DE PACIENTES.....	26
IV. MÉTODOS	
IV.1. FASES DEL ESTUDIO	27
IV.2. TÉCNICA ANESTÉSICA	28
IV.3. MONITORIZACIÓN.	29
IV.4. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS.....	29
IV.5. ESTUDIO ESTADISTICO.....	30
IV.6. MÉTODOS DE LABORATORIO.....	
IV.6.1. VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN POMC.....	32
IV.6.2. MEDICIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE ACTH.....	33
V. RESULTADOS	
V.1. DATOS DEMOGRAFICOS.....	40
V.2. VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENETICA DE POMC.....	42
V.3. NIVELES PLASMATICOS DE ACTH.....	53
VI. DISCUSIÓN.....	69
VII. CONCLUSIONES.....	75
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	77
IX. ANEXO: CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	88

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. RESPUESTA INMUNO- METABOLICA AL ESTRÉS QUIRURGICO.

En 1914, Cannon ⁽¹⁾ demostró que tras una lesión existía una alteración neuroendocrina y el organismo reaccionaba a la cirugía con una respuesta específica.

El concepto de estrés fue introducido en medicina en 1936 por Hans Selye ⁽²⁾ que lo definió como “el estado que se manifiesta por un síndrome específico consistente en todos los cambios inespecíficos inducidos dentro de un sistema biológico”. El **síndrome general de adaptación** como él lo llamó, presentaba una serie de características:

- La primera era el efecto general del síndrome con una respuesta similar ante distintos tipos de estímulos.
- La segunda, su capacidad de adaptación o resistencia al estimular las defensas del organismo frente a los agentes nocivos.
- La tercera, la importancia del eje adrenocortical con su secreción de glucocorticoides durante el estrés.

En 1953, Moore ⁽³⁾ describió las fases de la convalecencia quirúrgica, teniendo el mérito de relacionar las manifestaciones clínicas observadas en los enfermos con los hechos fisiopatológicos. Describió una primera fase de reacción o adrenocorticoidea, una segunda fase de crisis o de retirada corticoidea, una tercera fase anabólica y una cuarta y última fase de aumento de grasa.

Cualquier tipo de agresión quirúrgica desencadena una reacción por parte del organismo en dos formas: una respuesta local (reacción inflamatoria) que asienta en los tejidos directamente sometidos al trauma quirúrgico y una

respuesta sistémica del organismo encaminada a restaurar la homeostasis y mantener su integridad para hacerlo salir cuanto antes, y defenderse, de la situación anormal a la que se ve sometido. Dichas respuestas se consideran normales, y por lo tanto fisiológicas e inespecíficas y dependientes de manera proporcional a la intensidad y gravedad de la agresión quirúrgica.

El mantenimiento de la homeostasis se consigue activando el metabolismo energético partiendo de una serie de estímulos de variada índole que producen la liberación de ciertas hormonas que se consideran **marcadores** de la respuesta al estrés o de la respuesta del organismo a la lesión quirúrgica.

En situaciones de estrés, el sistema nervioso central (SNC) recibe estímulos aferentes del sistema nervioso periférico, de los quimiorreceptores y barorreceptores. La respuesta neuroendocrina a estos estímulos aferentes se puede considerar la respuesta eferente del SNC a nivel suprasegmentario.

Trabajos experimentales clásicos demostraron que para que ocurran ciertas respuestas endocrinas, como la que media la liberación de cortisol por la acción de ACTH, es necesario que estén intactos el estímulo neural y la transducción de la señal a SNC ⁽⁴⁾. De manera similar, no existe respuesta de ACTH a operaciones en pacientes parapléjicos con transección de la médula espinal a nivel de T4.

Wilmore ⁽⁵⁾ en 1976, demostró que los cambios en los impulsos neuronales aferentes al área hipotalámica alteraban los mecanismos homeostáticos centrales con los consecuentes cambios en las funciones pituitarias y autónomas. La actividad aferente, tanto somática como autónoma, es importante para iniciar la respuesta al estrés.

La respuesta a estímulos nociceptivos requiere vías neurales intactas. La analgesia “per sé” no inhibe los cambios hormonales⁽⁶⁾.

Los fármacos anestésicos pueden iniciar, inhibir o aumentar reflejos neuroendocrinos y por tanto deben considerarse como un factor adicional en la respuesta de lesión a una intervención quirúrgica.

Engquist y cols. ^(7,8) y Kehlet ⁽⁹⁾, demostraron que la anestesia locorregional, tanto la subaracnoidea como la epidural, bloquean el estímulo neurogénico desde el área lesionada y pueden atenuar la respuesta hormonal limitando el aumento plasmático de las catecolaminas, ACTH, aldosterona, cortisol, renina y prolactina. A pesar de atenuar la respuesta al estrés, la anestesia regional no puede bloquear completamente la inervación autónoma, de ahí un efecto limitado sobre el incremento de la secreción hipotálamo-hipofisaria observada durante la cirugía ^(7, 10). El hipotálamo tiene efecto coordinador central sobre la respuesta endocrina. Los impulsos aferentes estimulan la secreción de factores hipotalámicos liberadores que a su vez estimulan la hipófisis produciendo la secreción de proopiomelanocortina (POMC).

En la respuesta al estrés no solo está implicado el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, sino también el sistema opioide endógeno. El factor liberador de la hormona corticotropa (CRH) actúa sinérgicamente con la vasopresina estimulando la secreción de la POMC por la hipófisis. La POMC es metabolizada a ACTH y a beta-endorfinas, de ahí que exista un eslabón entre los opioides endógenos y el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal. ^(11,12)

I.2. PROOPIOMELANOCORTINA. (POMC)

La Proopiomelanocortina es una molécula inactiva precursora de los pépticos activos: Adrenocorticotropina (ACTH), Hormona estimulante de melanocitos (MSH) y Beta-endorfinas:

- **ACTH**: Estimula la corteza suprarrenal e induce la función adrenal, regula la homeostasis interna manteniendo el tono y permeabilidad vascular y la distribución del agua corporal total.

- **MSH**: Estimula la melanogénesis y pigmentación. Sus receptores MC4-R cerebrales están implicados en la obesidad e hiperfagia ^(13,14).

- **Beta-endorfinas**: A través de receptores opiáceos, produce la modulación inhibitoria de la información nociceptiva.

El síndrome de déficit de POMC ⁽¹⁵⁾ se expresa fenotípicamente por obesidad mórbida, pelo pelirrojo e intolerancia al estrés⁽¹⁶⁾. El déficit completo de POMC es muy poco frecuente. Existen más frecuentemente polimorfismos de este gen ⁽¹⁷⁾, con alteración de la expresión de POMC, que en un futuro podrían ser de utilidad en el diagnóstico preanestésico y valorar el riesgo quirúrgico de estos pacientes.

El gen POMC se localiza en el cromosoma 2 (Cr2 -23p). Está compuesto por 3 exones y 2 intrones:

Exon 1. No se transmite, extremo 5' mRNA.

Exon 2. Contiene la señal de secuencia para procesar la proteína.

Exon 3. Codifica los pépticos activos: ACTH, MSH y beta-endorfinas.

A nivel central en el eje hipotálamo-hipofisario la expresión del gen POMC es completa, pero a nivel periférico (en linfocitos sanguíneos) se pierde la expresión del exon 1 y 2, denominándose a la molécula “5' truncated POMC”, y no hay secreción de ACTH por pérdida de la secuencia señal de POMC ⁽¹⁸⁾.

I.3. OPIACEOS SISTEMICOS E INTRATECALES.

Diferentes estudios demuestran variaciones en la expresión del gen de proopiomelanocortina en hipotálamo e hipófisis relacionadas con la respuesta a terapias analgésicas con morfina ⁽¹⁹⁾ y al estrés ⁽²⁰⁾.

En estudios con altas dosis de opiáceos, se ha conseguido una disminución marcada de la respuesta hormonal a la cirugía ⁽²¹⁾. La morfina y otros opiáceos actúan produciendo una inhibición dosis-dependiente de la respuesta al estrés, disminuyendo de forma proporcional la elevación de las catecolaminas plasmáticas inducidas quirúrgicamente^(21, 22). Sin embargo, la dosis de opioides sistémicos necesaria para producir una completa abolición de la respuesta hormonal debe ser muy alta (en el caso del fentanilo 100 µgr/Kg) dando lugar a una depresión respiratoria que precisaría de ventilación mecánica en el periodo postoperatorio ⁽²²⁾.

La hiperalgia y alodinia inducida por opioides ha sido observada en el modelo animal ⁽²³⁾ así como la tolerancia aguda a opioides tras la infusión larga de opiáceos de acción corta ⁽²⁴⁾.

La metadona es altamente liposoluble ⁽³²⁾, con una vida media de unas 23 horas, pudiendo variar entre 13 y 54 horas. Las vías intravenosa, intradural, y epidural, se han mostrado eficaces y seguras para el tratamiento del dolor postoperatorio.

La metadona se une fundamentalmente a los receptores opioides mu, pero además es un antagonista no competitivo de los receptores de N-metil-D-Asparatato (NMDA). La utilización de la metadona permite mejorar el control del dolor al disminuir el desarrollo de tolerancia a los opioides.

Los receptores NMDA están asociados con los procesos de aprendizaje y memoria, el desarrollo y la plasticidad neural, así como con los estados de dolor agudo y crónico. Intervienen en el inicio y mantenimiento de la sensibilización central asociada a daño o inflamación de los tejidos periféricos ^(27,28).

El glutamato es el principal aminoácido excitatorio del SNC, puede participar en los procesos de transmisión nociceptiva a nivel espinal, siendo el principal responsable de la transmisión sináptica rápida. La acción del glutamato en las vías del dolor está mediada en su mayor parte a través de receptores ionotrópicos (Ac alfa-amino 3-hidroxy 5-methylisoxazolen 4-propionico AMPA, NMDA y kaínicos). La activación de los receptores NMDA juega un papel importante en la neurotransmisión excitatoria y la plasticidad sináptica del SNC.

El glutamato o sus agonistas (NMDA, AMPA y ácido kaínico) están involucrados en los procesos de generación y mantenimiento de los estados de hiperalgesia (respuesta exacerbada al estímulo nocivo) y alodinia (disminución del umbral doloroso). El glutamato es un importante neurotransmisor involucrado en la transmisión de estímulos nociceptivos en el SNC ^(38,39).

Los estudios farmacológicos en los cuales se aplica glutamato o un agonista de los receptores de glutamato resultan en una despolarización de las células ganglionares del asta dorsal, lo que determina que sus receptores están ubicados en dichas localizaciones ^(38,40).

Existen varios subtipos de los receptores de glutamato como el n metil d aspartato (NMDA), el ácido alfa amino 3 hidroxy 5 methylisoxazole 4 propionico (AMPA) y el ácido kainato (ak). La presencia de estos receptores a nivel periférico y sus posibles implicaciones terapéuticas están siendo motivo de investigación actualmente ^(39,41).

El dolor crónico puede ser mantenido por un estado de sensibilización dentro del SNC que está mediado en parte por los aminoácidos excitatorios: glutamato y aspartato, cuando se unen a los receptores NMDA ⁽⁴²⁾.

Los receptores NMDA regulan, a través de un complejo mecanismo, la entrada del ion Calcio a la célula, del entorno extracelular, lo que en último término se traduce en excitabilidad intracelular dependiente del ion Calcio de los mensajeros segundo y tercero ⁽⁴³⁾. En condiciones normales, los receptores NMDA están bloqueados por el magnesio. Sin embargo, los aminoácidos excitatorios como el aspartato, glutamato y los pépticos neuromoduladores como la sustancia p, pueden removerlo de su sitio de unión, lo que permite la entrada de calcio en las neuronas de amplio rango del asta dorsal ^(38, 43). El resultado final es una forma de sensibilización central a los estímulos nociceptivos periféricos que se manifiesta por alodinia e hiperalgesia ⁽⁴²⁾.

El d-isomero de la metadona es un antagonista del receptor N-metil-D-Aspartato, NMDA, y actúa como atenuador del desarrollo de tolerancia a la morfina y de la hiperalgesia y alodinia inducida por la modificación del receptor de NMDA ⁽²⁵⁾.

La administración intratecal de antagonistas de NMDA puede reducir y prevenir los estados de facilitación (*wind-up*) progresiva de las neuronas del asta dorsal a los impulsos aferentes transmitidos por las fibras C, pero no la respuesta al estímulo nociceptivo agudo ⁽³³⁾.

Los receptores de NMDA se localizan en las células del asta posterior de la médula espinal (ME), después de la sinapsis, son los encargados de mediar la reacción generada por la descarga polisináptica de fibras aferentes primarias nociceptivas. La activación de los receptores NMDA se relaciona con la transmisión en fibras aferentes nociceptivas, posiblemente fibras A delta y C ⁽²⁶⁾.

La estimulación repetitiva de fibras C origina un aumento del tamaño de los campos receptivos y de la respuesta de las neuronas nociceptivas espinales a los estímulos adecuados. Este fenómeno, denominado "*wind-up*", está mediado por la liberación de glutamato y sustancia P (SP) por aferencias primarias de tipo C, que actúan sobre receptores NMDA y neurocinina1 (NK1). La vía final común de la activación del receptor NK1 y NMDA es el incremento de calcio intracelular libre ionizado, que puede explicar la hiperexcitabilidad neuronal persistente. La activación de estos receptores puede activar la proteína-quinasa C por la vía de la cascada de inosítoles. La activación de estos receptores produce la síntesis de prostaglandinas y de óxido nítrico. La facilitación lenta y conservada, depende de la correlación de neurocininas, especialmente la SP y aminoácidos excitadores (AE), que actúan sobre los receptores NMDA. La facilitación es bloqueada por antagonistas de los NMDA y antagonistas específicos del receptor de NK1, que se postula es el principal lugar de unión de la SP ^(27,29-31).

I.4. HISTORIA DEL PROYECTO.

Nuestra línea de investigación está orientada hacia el estudio del dolor postoperatorio en nuestra práctica clínica, intentamos encontrar una relación con la modulación inhibitoria de la información nociceptiva que realiza el sistema opioide endógeno. Con especial interés en medir las variaciones del sistema opioide endógeno, en concreto la expresión del gen POMC, en determinados momentos de la cirugía y con distintos métodos anestésicos. Hipotetizando que al haber diferentes grados de dolor encontraríamos variaciones en la expresión del gen POMC.

Se eligió como método anestésico la anestesia raquídea asociando un opiáceo intratecal. En 1999 se comienza a realizar tratamiento con metadona intratecal en diferentes actos quirúrgicos programados en el Hospital Universitario de Bellvitge. Bajo la supervisión de Servicio de Farmacología Clínica y el Comité Ético de Investigación se protocoliza la dosis intraquirúrgica y la analgesia postoperatoria con metadona intratecal en la cirugía ortopédica en el Hospital Universitario de Bellvitge.

Se realiza un análisis de la eficacia analgésica, seguridad y efectos secundarios en pacientes sometidos a cirugía bajo anestesia intradural con metadona intratecal ^(34, 35).

Para la medición del RNAm de POMC en linfocitos periféricos se imitó el método utilizado en el artículo "*Quantification of Proopiomelanocortin mRNA in peripheral lymphocytes of alcoholics*" Winkler A. et al. Alcohol. Vol. 15. No. 1. pp. 43-50. 1998, cuyo "*primer*" media el exon 3, ya que la bibliografía en aquel momento era escasa. El 1 de Junio del 2001 da comienzo el proyecto de investigación (ref.143/00): "Cuantificación de la expresión del gen POMC en pacientes sometidos a cirugía bajo anestesia intradural"⁽³⁶⁾.

Se estudiaron los primeros 4 pacientes, intervenidos de cirugía protésica y fractura de fémur, bajo anestesia intradural con dos tipos de tratamientos:

A) Bupivacaina al 0,5% =12 mgr en las 2 prótesis.

B) Bupivacaina al 0,5% =12mgr

+ Metadona al 1% = 4 mgr en las 2 fracturas de fémur.

Los parámetros valorados fueron :

1. Escala Visual Analógica.

Los valores más altos de EVA en la cirugía protésica aparecen en la Fase III o postoperatorio inmediato. En las fracturas de fémur se anota la valoración máxima de EVA en la Fase I preanestésica. Los valores mínimos de EVA ocurren en la Fase II o intraquirúrgica de los 4 pacientes y en la Fase III de los pacientes tratados con metadona intratecal.

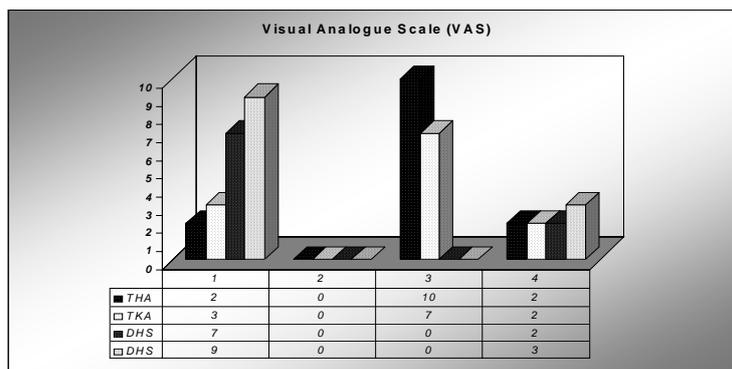


figura 1. Valores de EVA en las cuatro fases del estudio.

2. RT-PCR del gen POMC

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa – transcriptasa reversa se obtiene la amplificación de un fragmento del exon 3 de POMC (banda 153 bp) en todas las fases del estudio.

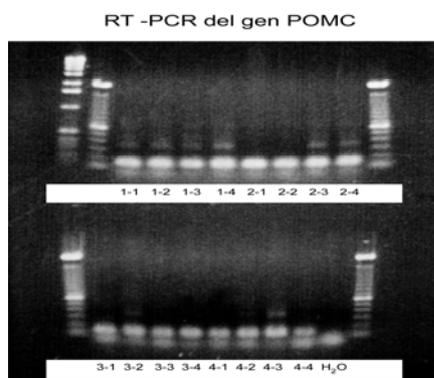


Figura 2. Valoración mediante electroforesis en Agarosa al 1% de la RT-PCR del gen POMC en cuatro pacientes a diferentes tiempos de su intervención quirúrgica.

3. PCR cuantitativa en tiempo real.

La cuantificación de la expresión del exon 1 de POMC aparece en la Fase IV o postoperatorio tardío de los 4 pacientes.

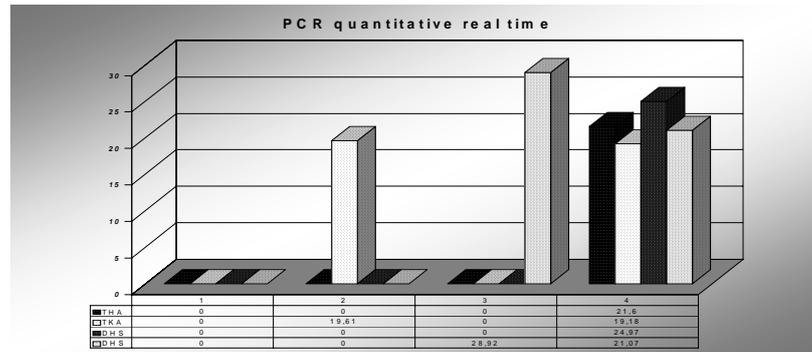


Figura 3. Valores del exon 1 en las cuatro fases del estudio, mediante un sistema de RT-PCR a tiempo real de Applied Biosystems (7500 Fast Real-Time PCR System), con un equipo "Assay by demand" para el estudio del gen POMC.

En los 4 pacientes se buscaba una relación entre la analgesia postoperatoria (con o sin opiáceos intratecales), medida por la escala visual analógica (EVA) y la expresión de POMC. En este estudio no encontramos correlación entre los valores de EVA y la cuantificación de la expresión de POMC.

En los momentos álgidos de máximo valor de EVA no hay amplificación del exon 1 por PCR en tiempo real, y si hay expresión de la banda que corresponde al exon 3 de POMC por RT-PCR. Todos los pacientes a las 24/48h de la intervención quirúrgica expresan el gen completo de POMC.⁽³⁶⁾

En Octubre del 2004 se comienza un segundo estudio con 8 pacientes programados para cirugía de Adenomectomía retropubica prostática, con la misma metodología, obteniendo los mismos resultados que en el estudio previo:

Exon 1 en el postoperatorio tardío, fase IV

Exon 3 en todas las fases. Resumen de resultados⁽³⁷⁾.

Estos estudios previos nos mostraban que las variaciones de la expresión del gen POMC en linfocitos periféricos de todos los pacientes presentaba un descenso significativo entre la fase I y la II, con un aumento paulatino hasta la fase IV.

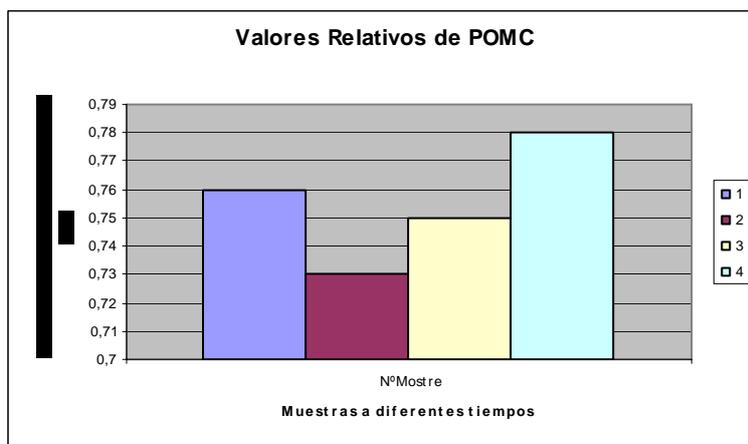


Figura 4. Valores de POMC en las cuatro fases del estudio, obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa en un sistema LightCycler® de Roche a tiempo real. P/G representa la relación POMC/GAPDH, donde GAPDH se ha utilizado como gen de referencia, dada su expresión constante en linfocitos

Con estos resultados nuestro punto de mira se dirigió a la posibilidad de realizar un nuevo estudio (la presente tesis) donde, homogeneizando los más posible las diferentes variables (tipo de cirugía, técnica anestésica), pudiéramos medir los valores de POMC en diferentes fases perioperatorias predeterminadas y así observar y en lo posible comprender el modo de proceder de nuestro sistema opioide endógeno durante el estrés quirúrgico.

Justificación del trabajo y objetivos.

II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.

A pesar de que el control neuroendocrino durante el estrés quirúrgico depende del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, la liberación de catecolaminas y glucocorticoides que actúan sobre múltiples tejidos y órganos periféricos de forma inmediata, podría tener un reflejo en la producción de beta-endorfinas y ACTH como consecuencia de su influencia sobre la expresión del gen *POMC* en las células de sangre periférica. Aunque se han demostrado variaciones en la expresión de la *POMC* en linfocitos de sangre periférica en diferentes situaciones y se conoce la influencia de factores neuroendocrinos sobre la respuesta inmunológica en situaciones de estrés, no existe un estudio sobre la influencia del estrés quirúrgico sobre la expresión de este gen.

El estudio cuantitativo de la expresión del gen POMC, en situaciones de estrés perioperatorio, tiene interés en dos vertientes de impacto clínico:

A) La correlación entre la expresión de este gen (POMC), los niveles plasmáticos de ACTH, y otros parámetros relativos al dolor para tratar de encontrar una medida cuantitativa indirecta pero objetiva.

B) La selección de un posible déficit de esta molécula, para establecer protocolos adecuados de control de la intolerancia al estrés.

En este sentido, existen algunos aspectos fenotípicos que permiten una selección previa de la población susceptible, como son: Obesidad y alteraciones de la pigmentación. En un futuro podría ser utilizado como despistaje preanestésico de pacientes con déficit de POMC parcial o total, que pueden suponer riesgos no tenidos en cuenta durante el estrés perioperatorio (Como déficit de ACTH) y el tratamiento del dolor postoperatorio (déficit de beta-endorfina).

II.1. OBJETIVOS

1.- Cuantificar las variaciones de la expresión del gen POMC en linfocitos periféricos y los niveles plasmáticos de ACTH, que ocurren durante el estrés anestésico - quirúrgico, utilizando anestesia locorregional subaracnoidea con bupivacaína más metadona.

2.- Estudiar las variaciones de estos parámetros, la expresión del gen POMC en linfocitos periféricos y los niveles plasmáticos de ACTH, en diferentes momentos perioperatorios:

- Prequirúrgico.
- Intraquirúrgico.
- Postoperatorio inmediato.
- Postoperatorio tardío.

Pacientes y Métodos.

III. PACIENTES.

III.1. SELECCIÓN DE PACIENTES.

Se ha realizado un estudio clínico prospectivo en 23 pacientes con edades comprendidas entre los 51 y 83 años, media de edad de $66,78 \pm 8,74$ DE, 13 hombres y 10 mujeres, que pertenecían a los grados II y III de la clasificación ASA, programados para cirugía de prótesis de cadera, en el Hospital Universitario de Bellvitge, en el 2005 y 2006. Todas las intervenciones fueron realizadas por el mismo equipo quirúrgico y la misma anestesista.

Criterios de inclusión:

- Pacientes del sexo femenino o masculino programados para cirugía de prótesis total de cadera.
- Conformidad del paciente para formar parte del estudio con consentimiento informado escrito y aceptado.
- Riesgo preoperatorio menor o igual a III según la escala de la Sociedad Americana de Anestesiología (ASA).

Criterios de exclusión:

- Demencia
- Alergia a alguno de los fármacos utilizados durante el estudio.
- Contraindicación de anestesia subaracnoidea.
- Trombocitopenia.
- Alteración de pruebas de coagulación por discrasias sanguíneas.
- Infección en el lugar de punción.
- Anticoagulación previa.
- Negativa del paciente a la anestesia intrarraquidea.
- Enfermedad neurológica previa.
- Consentimiento informado no aceptado o no firmado

IV. MÉTODOS.

IV.1. FASES DEL ESTUDIO.

1ª FASE: Preoperatoriamente se anotaron constantes básicas:

Tensión arterial, frecuencia cardíaca, Saturación de oxígeno por pulsímetría y Escala Visual Analógica (EVA).

2ª FASE: Intraoperatoria al instaurarse el bloqueo sensitivo-motor después de la anestesia subaracnoidea. Valorando el nivel sensitivo metamérico mediante la pérdida de sensibilidad al pinchazo (pinprick) y la motricidad con la escala modificada de Bromage. El límite superior del bloqueo previo a la incisión de la piel estuvo entre L₁- T₈.

3ª FASE: En la sala de Reanimación posquirúrgica al revertirse el bloqueo sensitivo. Se comenzó la analgesia postoperatoria protocolizada, cuantificando las dosis requeridas

4ª FASE: A las 8h a.m. del 2º día de la intervención quirúrgica. Paciente ingresado en la planta quirúrgica con cobertura analgésica. Midiendo el grado de satisfacción del paciente (excelente, bueno, regular y malo), y el consumo analgésico de las primeras 48h.

Junto con cada muestra se anotó la valoración de la Escala Visual Analógica.

IV.2. TÉCNICA ANESTÉSICA.

Se realizó estudio preoperatorio con una historia clínica detallada y pruebas complementarias consistentes en una radiografía de tórax, ECG, análisis bioquímico sanguíneo, estudio de coagulación, electrolitos, creatinina y glucosa.

La anestesia intradural se realizó con el paciente en decúbito lateral del lado no quirúrgico, o en sedestación. El espacio subaracnoideo se identificó utilizando un abordaje medial en el tercer o cuarto espacio lumbar. La punción se realizó con una aguja espinal del calibre 27 (Sprotte punta lápiz) y se introdujo una solución de bupivacaína y metadona a las dosis siguientes

Bupivacaína 0,75% -- 1cc : 7,5mgr

Bupivacaína 0,5% -- 1cc : 5mgr

Metadona 1% -- 0,5cc : 5mgr

Volumen total : 2,5cc.

Sedación: Midazolam, 0,05 mgr/Kg .

Fentanilo, 1 μ gr/Kg.

Tratamiento profiláctico o preventivo: Dexclorfeniramina 5 mgr

Ondansetron 4 mgr

Profilaxis antibiótica: Cefazolina 2 gr.

Clindamicina 600 mgr si alergia a β -lactámicos.

A todos los pacientes se les colocó una cánula nasal de O₂.

La infusión intravenosa perioperatoria de fluidos, cristaloides, coloides o sangre se basó en la duración de la cirugía, peso corporal, hematocrito y pérdidas sanguíneas así como en el mantenimiento de los parámetros hemodinámicas y hematológicos.

El protocolo de analgesia postoperatoria fue:

Metamizol 2 gr e.v. /6h y paracetamol 1 gr e.v. /12h alternos, y rescate con

Dexketoprofeno 50 mgr e.v. /12h.

Si prurito Dexclorfeniramina 5mgr e.v./8h

Si vómitos Ondansetron 4 mgr e.v./12h.

IV.3. MONITORIZACIÓN.

La cirugía se realizó siempre por la mañana, entre las 9 y las 15 horas, el paciente era llevado a la sala preanestésica aproximadamente una hora antes del inicio de la cirugía, al entrar al quirófano se canalizaba un catéter del calibre 18G en una vena del brazo.

Monitorización anestésica recomendada por la Sociedad Española de Anestesia, Reanimación y Terapéutica del dolor (SEDAR):

- ECG de las derivaciones II y V5
- Pulsimetría
- Tensión arterial incruenta.

Y también sonda vesical para cuantificación de diuresis horaria y vía venosa central a través de vena basilica para medición de PVC.

IV.4. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS.

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas a través de catéter venoso en cada una de las cuatro fases del estudio.

- 5cc de sangre, en tubos con EDTA, para la determinación de POMC
- 3cc de sangre para determinar ACTH, mantenidas en hielo hasta su centrifugación dentro de los 30 minutos siguientes a su extracción.

IV.5. ESTUDIO ESTADISTICO

El estudio estadístico de los resultados se ha realizado mediante:

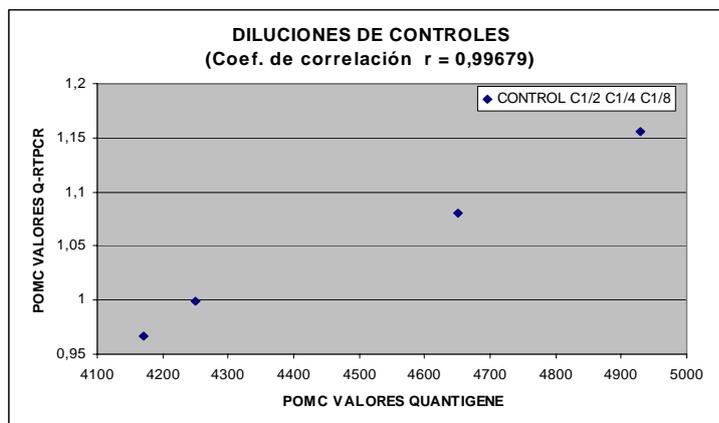
- Estadística descriptiva para los datos demográficos con el cálculo de frecuencias, medias y desviación estándar. Las variables categóricas se presentaron en tablas de frecuencias y rangos. Las variables continuas en promedios y desviación estándar, o bien en medianas y rango intercuantil, según su distribución normal o no normal. Las pruebas de normalidad utilizadas fueron Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk.
- Estadísticos de contraste para la comparación de las medias en este estudio longitudinal para datos apareados se utilizó el test de Friedman que consiste en asignar rangos a las observaciones de un mismo individuo, es decir si existen 4 mediciones de una misma observación para un mismo individuo registradas en diferentes momentos del tiempo, se ordenarán las 4 observaciones para cada individuo y se les asignará un rango que oscilará entre 1 y 4.
Se repitió este estudio sin los valores extremos “*outliers*” en las mediciones de POMC1, POMC2, ACTH3 y ACTH4, y se realizaron las correlaciones entre variables cuantitativas y las correlaciones no paramétricas.
- Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el “*software*” informático SPSS
- Se han empleado dos métodos para el estudio de la expresión génica de la POMC en células mononucleadas de sangre periférica, para determinar que ambos métodos son capaces de valorar diferentes muestras de una manera precisa, no dependiente de la concentración de ARN o del método empleado, se tomaron tres muestras control provenientes de donantes sanos y tras la extracción de ARN, se

realizaron diluciones sucesivas 1:2. Este banco de diluciones se valoró por duplicado mediante los citados métodos. Para determinar si los dos métodos medían la POMC de la misma manera, se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson, que es un índice estadístico que mide la relación lineal entre dos variables cuantitativas. A diferencia de la covarianza, la correlación de Pearson es independiente de la escala de medida de las variables.

El cálculo del coeficiente de correlación lineal se realiza dividiendo la covarianza por el producto de las desviaciones estándar de ambas variables:

El valor del índice de correlación varía en el intervalo [-1 , +1]:

Se dice que una correlación es significativa si la misma se encuentra entre [-1 ; -0,7] o [1 ; 0,7]



Como se observa en la gráfica, existe un valor de correlación muy elevado ($r=0,99679$), en las medidas de POMC hasta una dilución 1/8, a mayor dilución el coeficiente de correlación desciende considerablemente, siendo de $r=0,8006154$, para la dilución 1/16. Sin embargo, este valor ya se encuentra cerca del rango de sensibilidad del método de la PCR cuantitativa a tiempo real.

IV.6. METODOS DE LABORATORIO.

IV.61. VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DEL GEN PROOPIOMELANOCORTINA (*POMC*) EN CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGRE PERIFÉRICA

1. OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGRE PERIFÉRICA MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD Y EXTRACCIÓN DE SU ARN TOTAL

Aunque existen diferentes técnicas de extracción del ARN de sangre total, el hecho de que sea en los linfocitos, y tratando de evitar que la presencia de transcritos de este gen en otras células de sangre periférica pudieran distorsionar el estudio, se decidió realizar la purificación de las células mononucleadas por un método estándar de centrifugación en gradiente de densidad de las muestras ha estudio, antes de la purificación del material genético.

Esta técnica se basa en las diferentes densidades de las células con respecto al material formador del gradiente, el Ficoll. Las células con mayor densidad que el Ficoll (eritrocitos y polimorfonucleadas), atravesarán el gradiente al someter a la sangre a centrifugación, mientras que los monocitos y linfocitos por su menor densidad quedarán retenidos en una banda en la interfase entre el gradiente y la fase plasmática, las plaquetas por su baja densidad quedarán en la fase plasmática.

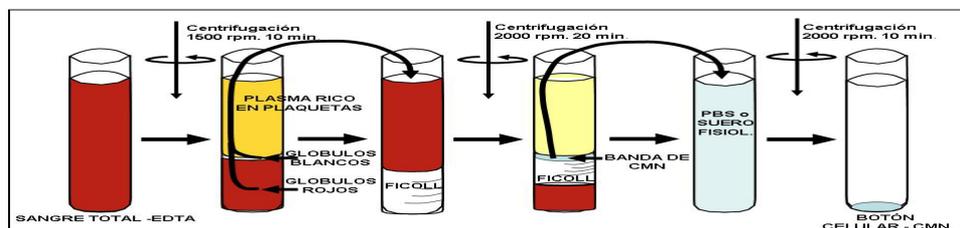


Figura 1. Esquema de la obtención de Células Mononucleadas (CMN) de sangre periférica, mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia).

2. PURIFICACIÓN DE ARN DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS

Aislar el ARN es un prerrequisito para el análisis de la expresión de un gen. El uso de técnicas tales como: RT-PCR, “*northern blotting*”, protección a la RNasa o “*primer extensión*” requiere el uso de muestras de ARN intacto, es decir, no degradado.

Los RNAs de las muestras aunque inicialmente se utilizó un método más simple y económico *Tripure*® de Roche, la posible presencia de ADN genómico contaminante que pudiera interferir en las valoraciones de la expresión génica de la POMC, nos hizo decantar por un método que conseguía un material final más puro, el “*High Pure Rna Isolation Kit*” de Roche.

3. VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DEL GEN PROOPiomELANOCORTINA EN CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Existen una cierta variedad de técnicas de laboratorio que permiten determinar el nivel de expresión de un ARN mensajero (ARNm) particular presente en una muestra biológica. Dependiendo de los recursos del laboratorio, el grado de precisión deseado y el número de dianas a medir, los investigadores eligen entre técnicas tales como: La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de una Transcripción Reversa (Q-RT-PCR o simplemente Q-PCR) (del inglés Reverse Transcriptase – Quantitative Polymerase Chain Reaction), los Northern blots, el análisis de protección a la RNasa o los microarrays de expresión, que son técnicas cada vez más simples y estandarizables, para que la información que aporta el estudio de la expresión de un determinado gen en una situación concreta, sea cada vez algo más asequible en la práctica clínica cotidiana.

La valoración de la expresión genética del gen *POMC* se abordó desde cuatro diferentes aproximaciones:

1. Una primera técnica puramente analítica, la RT-PCR a punto final, que nos informa de la presencia o ausencia de transcritos del gen: En este proceso, mediante el enzima Transcriptasa Reversa, del ARN obtenido de las muestras, se

produce el ADN complementario, del cual se amplifica una región concreta de un gen (en nuestro caso el exón 3 del gen *POMC*) mediante la técnica de la PCR, gracias a la presencia de cebadores (*primers*) específicos y del enzima termorresistente, Taq polimerasa en un aparato termociclador. Esta técnica es conocida como PCR a punto final, ya que el análisis se realiza al final de los treinta o cuarenta ciclos, lo cual no permite establecer la cantidad de ARN inicial, ya que tras tal cantidad de ciclos, el sistema se encuentra saturado por consumo de los productos (cebadores, Taq polimerasa, etc.) y todas las amplificaciones llegan a una meseta independiente del número de moléculas de ARN iniciales.

2. También se ensayaron dos técnicas basadas en la PCR cuantitativa en tiempo real. Como en el caso anterior, para realizar la PCR se requiere ADN, por lo que previamente se realiza una Transcripción Reversa de ARN. Ambas técnicas informan de las variaciones en la cantidad de ARN que había en las muestras en diferentes situaciones por comparación con el ARN de un gen cuya expresión permanezca constante en todas las situaciones (conocido en inglés como *House Keeping*). A continuación se describe sucintamente la base de estas dos técnicas y posteriormente se realizará una descripción pormenorizada de todo el procedimiento:

A. La primera de estas dos técnicas cuantitativas, se basa en la lectura continua de la fluorescencia que se incorpora al ADN amplificado por la reacción de la Taq polimerasa, gracias a un agente intercalante de las dobles cadenas de ADN, como es el SYBR Green. La amplificación del ADN es proporcional a la cantidad de ARN específico en la muestra original y a mayor amplificación, mayor incorporación de fluorescencia. El termociclador que permite la lectura continua de fluorescencia es un LightCycler[®] de Roche.

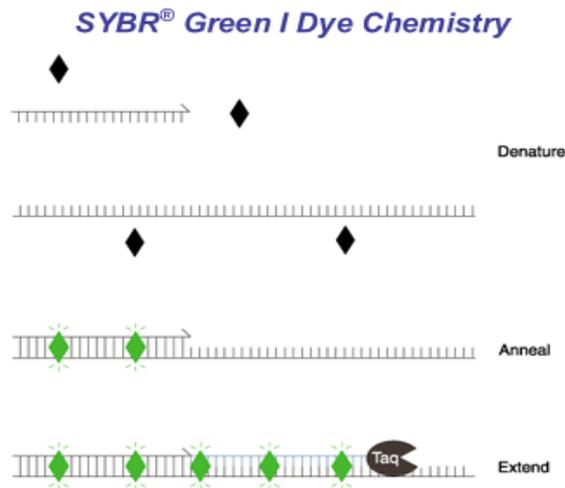


Figura 4. Esquema del proceso de marcaje mediante SYBR Green I del ADN amplificado durante el proceso de la RT-PCR a tiempo real. Las moléculas de SYBR Green I, se van intercalando en el ADN de doble cadena cuando la enzima Taq Polimerasa va generando una cadena complementaria.

B. La segunda técnica de PCR cuantitativa ensayada se basa en el mismo principio pero, en este caso junto a los cebadores específicos, se utiliza una sonda específica de la región amplificada (sondas taqman), que contiene en sus extremos unos marcadores fluorescentes, que se anulan entre si “*quenching*” y que la Taqpolimerasa libera cuando las sondas taqman hibridan con la secuencia específica durante el proceso de amplificación, quedando las nuevas hebras de ADN producidas marcadas con fluorescencia, que como en el caso anterior, será proporcional al número de copias generado. Este sistema ha sido estandarizado por la empresa Applied Biosystems, mediante unos equipos “*Assay by demand*” que gracias a su diseño de parámetros previamente fijados para el aparato 7500 Fast Real-Time PCR System permiten una aplicación directa del ensayo.

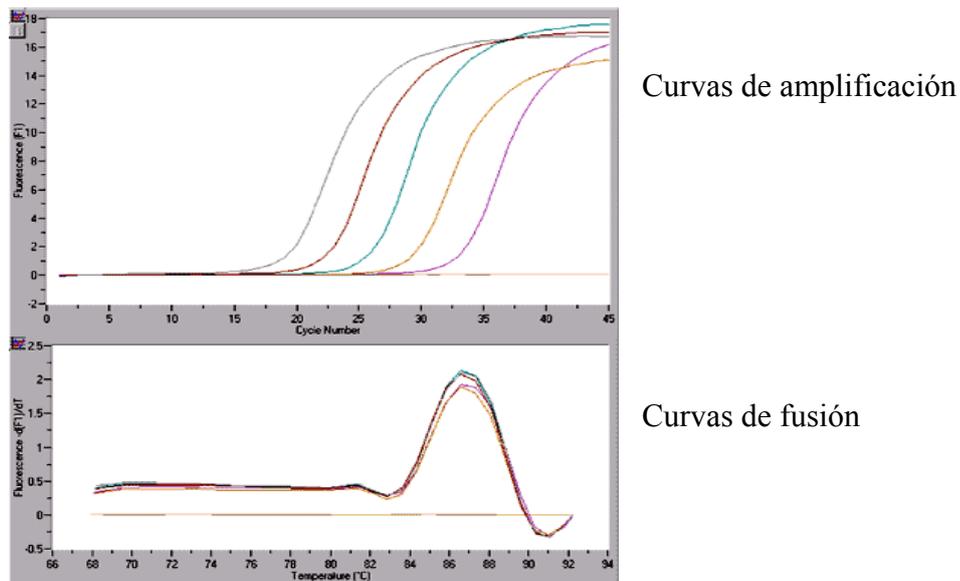


Figura 5. Ejemplo de una amplificación mediante el sistema de PCR a tiempo real LightCycler® de Roche. Cuando se produce la amplificación del ADN, el colorante SYBR green se intercala entre las dos hebras del ADN y emite fluorescencia, cuando se supera un determinado umbral, el sensor registra la fluorescencia asociada a cada muestra describiendo una curva (panel superior), que se iniciará en un ciclo de amplificación que depende del ARN inicial que tuviera la muestra (a mayor cantidad de ARN, menor cantidad de ciclos serán necesarios para superar el umbral). Las curvas de fusión, establecerán la pureza y especificidad de la amplificación, ya que los puntos de fusión de dos fragmentos distintos son diferentes y producirían curvas de fusión diversas.

3. Finalmente, buscando un ensayo cuantitativo de más fácil aplicación en caso de interés clínico, se probaron los equipos QuantiGene de la empresa Panomics (un diagrama esquemático del proceso se puede observar en la figura y cuya base teórica se describe a continuación:

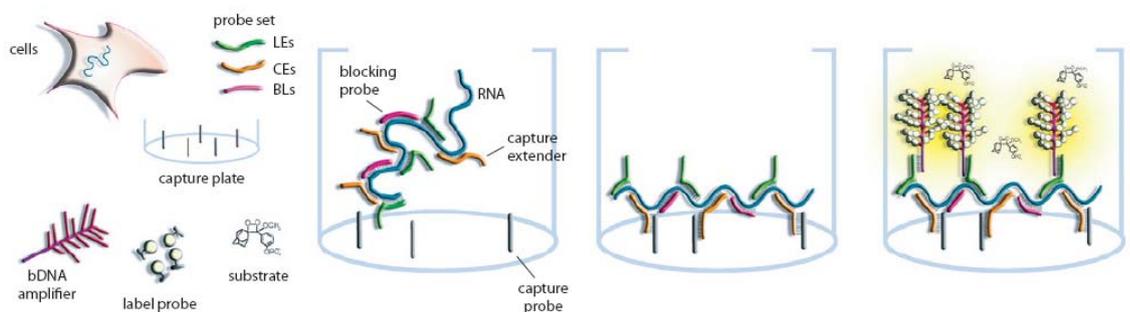


Figura 3. Esquema del proceso de valoración de la expresión de ARN de POMC mediante el sistema QuantiGene de Panomics. Este método utiliza una sonda ramificada, a la que se une el enzima fosfatasa alcalina, que mediante un sustrato consigue una amplificación de la señal de luminiscencia de 45 veces por cada molécula de Amplifier asociada con el ARNm diana.

El sistema QuantiGene es semejante al método inmunoenzimático de ELISA, pero en lugar de anticuerpos, en este caso la captura del ARN específico la realizan sondas de ADN unidas a una placa de pocillos y a otras que hibridarán con éste en solución. La cantidad de luminiscencia es proporcional al número de moléculas de ARN presentes en la muestra. El proceso se presenta de forma esquemática en la siguiente figura:

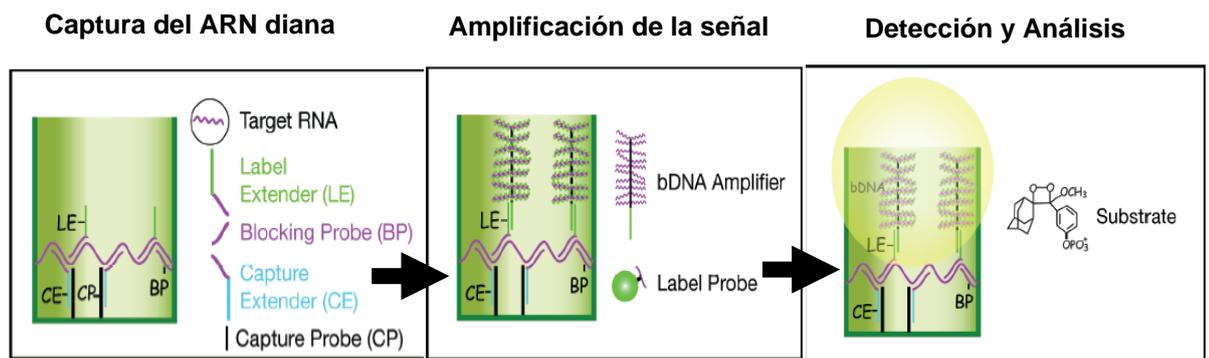


Figura 8 Cuantificación de ARN mensajero específico mediante Sistema QuantiGene de Panomics. El ARN problema se carga en una placa de 96 pocillos, en la que se encuentran adheridos fragmentos de ADN de secuencias establecidas, varias de las cuales son complementaria a ARN mensajero de la muestra problema (ver texto). La amplificación de la señal en este caso, no se produce por amplificación enzimática de la secuencia, como en la PCR, si no que una sonda de ADN ramificada (segunda etapa en el esquema) se une al complejo de forma proporcional al ARN mensajero inicial. Sobre esta sonda ramificada se unen sondas complementarias marcadas con la enzima fosfatasa alcalina y mediante un sustrato quimioluminogénico (tercera etapa del esquema) se genera luz que puede ser valorada en un luminómetro.

IV.6.2- MEDICIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE ACTH.

La hormona adrenocorticotropa (ACTH) es una hormona polipeptídica que existe principalmente como una cadena de 39 aminoácidos de largo, con un peso molecular de aproximadamente 4500 daltons. Se produce en la hipófisis y estimula la producción esteroidea de la corteza suprarrenal. La secreción de ACTH está a su vez controlada por el factor liberador de corticotropina (CRF) hipotalámico y por la retroalimentación negativa del cortisol.

Los niveles de ACTH plasmáticos exhiben una variación diurna significativa, y por ello es necesario estandarizar el horario de recolección de las muestras, los intervalos de referencia típicamente se han establecido para las 9 de la mañana aproximadamente.

Se midieron los niveles plasmáticos de ACTH en las cuatro fases del estudio en 10 pacientes, que representa un porcentaje del 43,5% del número de la muestra (n = 23 pacientes).

Se recogieron las muestras de sangre por venopunción (evitando la hemólisis) en tubos con EDTA en hielo, y se anotó la hora de la recolección, la muestra de la fase 4 se obtuvo a las 8h a.m. en los 10 pacientes estudiados.

Para el análisis de ACTH *in vitro* se utilizó el Analizador *INMULITE 2000*, *INMULITE 2000 ACTH* es un ensayo secuencial inmunométrico con dos sitios de unión quimioluminiscente en fase sólida.

Resultados.

V. RESULTADOS

V.1. DATOS DEMOGRAFICOS

Contamos con una población de 23 pacientes intervenidos quirúrgicamente de prótesis total de cadera, comprendidos entre los 51 y 83 años, cuya edad media es de 66.78 años con una desviación típica de 8,74.

Edad

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 51	1	4,3	4,3	4,3
54	1	4,3	4,3	8,7
57	1	4,3	4,3	13,0
59	2	8,7	8,7	21,7
61	1	4,3	4,3	26,1
62	2	8,7	8,7	34,8
63	1	4,3	4,3	39,1
64	1	4,3	4,3	43,5
66	2	8,7	8,7	52,2
68	1	4,3	4,3	56,5
69	4	17,4	17,4	73,9
70	1	4,3	4,3	78,3
71	1	4,3	4,3	82,6
80	1	4,3	4,3	87,0
81	1	4,3	4,3	91,3
83	2	8,7	8,7	100,0
Total	23	100,0	100,0	

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Edad	23	100,0%	0	,0%	23	100,0%

Descriptivos

			Estadístico	Error típ.
Edad	Media		66,78	1,824
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	63,00	
		Límite superior	70,57	
	Media recortada al 5%		66,74	
	Mediana		66,00	
	Varianza		76,542	
	Desv. típ.		8,749	
	Mínimo		51	
	Máximo		83	
	Rango		32	
	Amplitud intercuartil		9	
	Asimetría		,407	,481
	Curtosis		-,215	,935

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Edad	,141	23	,200*	,946	23	,246

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

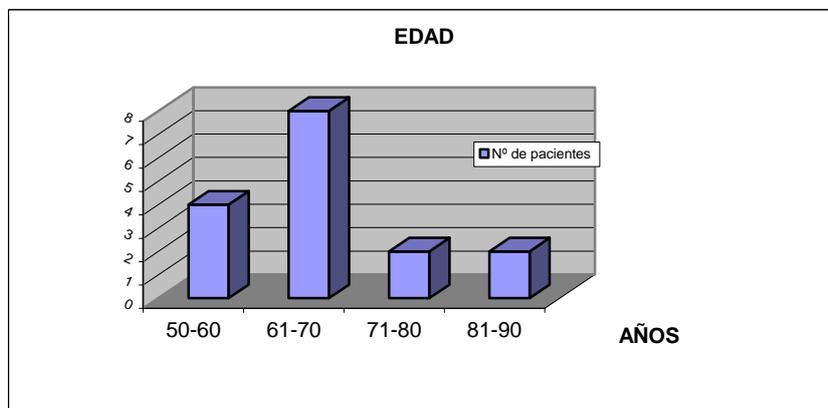


Figura 1. Distribución de la población por edades.

Con respecto al sexo fueron estudiados 13 hombres y 10 mujeres, que corresponden al 56,5% y el 43,5% del tamaño de la muestra, 23 pacientes, respectivamente.

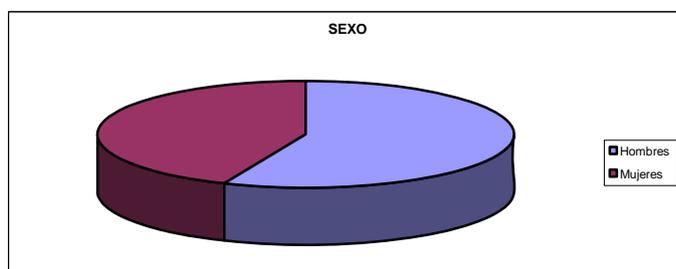


Figura 2. Distribución de la población por sexo.

IV.2. VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE POMC.

POMC1

Los valores de POMC en la fase 1 se procesaron en el 91,3% de los casos, siendo el 8.7% no validos.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
POMC 1	21	91,3%	2	8,7%	23	100,0%

La medición de POMC1 no sigue una distribución normal, su Mediana es de 6210 ciclos con una Amplitud intercuartil de 2550 ciclos

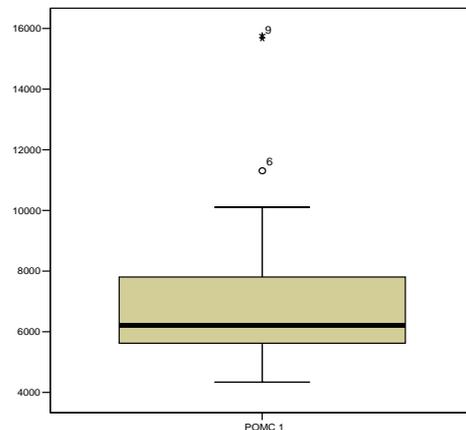
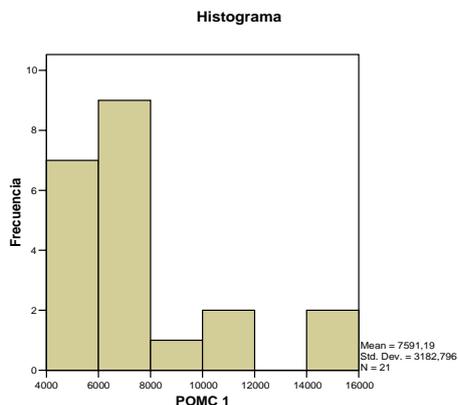
Descriptivos

		Estadístico	Error típ.
POMC 1	Media	7591,19	694,543
	Intervalo de confianza para la media al 95%		
	Límite inferior	6142,40	
	Límite superior	9039,98	
	Media recortada al 5%	7316,22	
	Mediana	6210,00	
	Varianza	10130192	
	Desv. típ.	3182,796	
	Mínimo	4335	
	Máximo	15775	
	Rango	11440	
	Amplitud intercuartil	2550	
	Asimetría	1,763	,501
	Curtosis	2,578	,972

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
POMC 1	,235	21	,004	,774	21	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors



POMC2

En el periodo intraoperatorio, fase 2, la POMC2 se procesa en el 87%, con el 13% de casos perdidos.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
POMC 2	20	87,0%	3	13,0%	23	100,0%

Presenta un valor con significación estadística con una Media de $5637,25 \pm 1205$ DE ciclos

Descriptivos

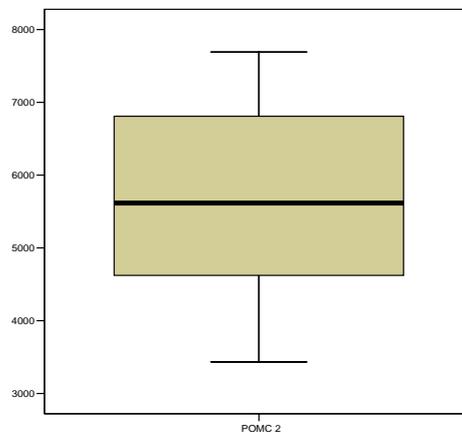
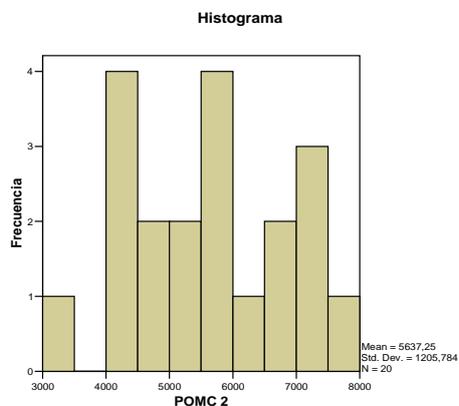
			Estadístico	Error típ.
POMC 2	Media		5637,25	269,621
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	5072,93	
		Límite superior	6201,57	
	Media recortada al 5%		5645,56	
	Mediana		5615,00	
	Varianza		1453914,4	
	Dev. típ.		1205,784	
	Mínimo		3435	
	Máximo		7690	
	Rango		4255	
	Amplitud intercuartil		2353	
	Asimetría		,015	,512
	Curtosis		-,964	,992

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
POMC 2	,114	20	,200*	,966	20	,678

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors



POMC3

En el postoperatorio inmediato, fase 3, se procesa POMC3 en el 91,3% de los casos, con el 8,7% de muestras perdidas.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
POMC 3	21	91,3%	2	8,7%	23	100,0%

Valor estadísticamente significativo con Media de 6536,67 ± 1833,53 DE ciclos.

Descriptivos

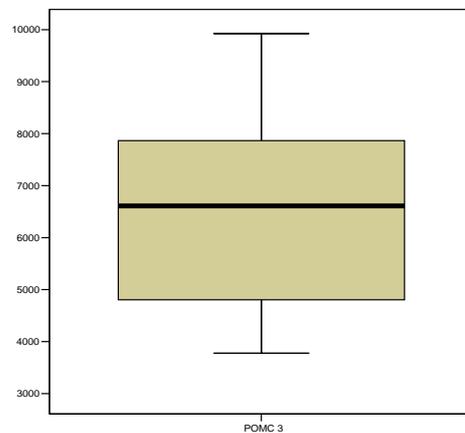
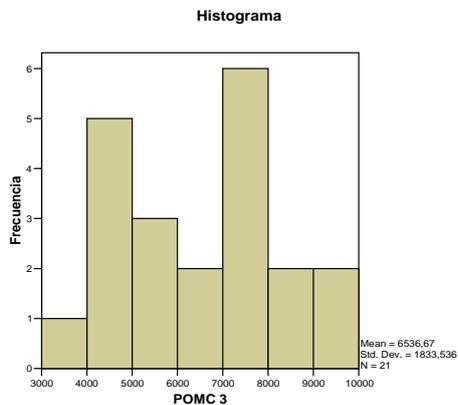
			Estadístico	Error típ.
POMC 3	Media		6536,67	400,110
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	5702,05	
		Límite superior	7371,28	
	Media recortada al 5%		6500,22	
	Mediana		6610,00	
	Varianza		3361853,3	
	Desv. típ.		1833,536	
	Mínimo		3775	
	Máximo		9925	
	Rango		6150	
	Amplitud intercuartil		3188	
	Asimetría		,315	,501
	Curtosis		-,934	,972

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
POMC 3	,127	21	,200 [*]	,945	21	,275

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors



POMC4

En el postoperatorio tardío, a las 48h de la intervención quirúrgica, fase 4, la POMC4 se procesó en el 91,3% de los casos, con un porcentaje del 8,7% de casos perdidos.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
POMC 4	21	91,3%	2	8,7%	23	100,0%

La medición de POMC4 no sigue una distribución normal, su mediana fue de 6215 ciclos con una Amplitud intercuartil de 2005 ciclos.

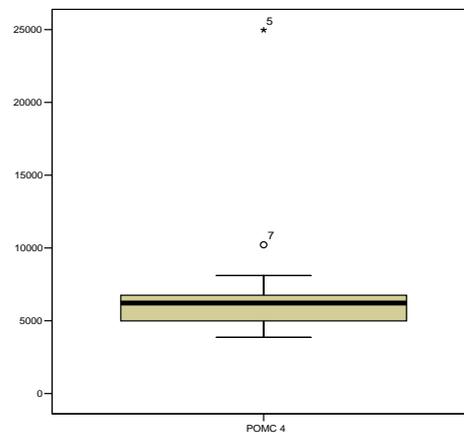
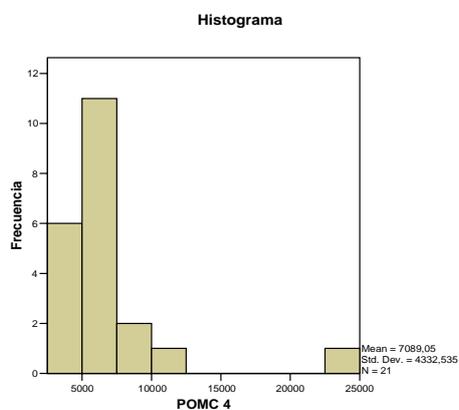
Descriptivos

		Estadístico	Error típ.
POMC 4	Media	7089,05	945,437
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior 5116,90 Límite superior 9061,19	
	Media recortada al 5%	6312,35	
	Mediana	6215,00	
	Varianza	18770862	
	Desv. típ.	4332,535	
	Mínimo	3860	
	Máximo	24970	
	Rango	21110	
	Amplitud intercuartil	2005	
	Asimetría	3,838	,501
	Curtosis	16,155	,972

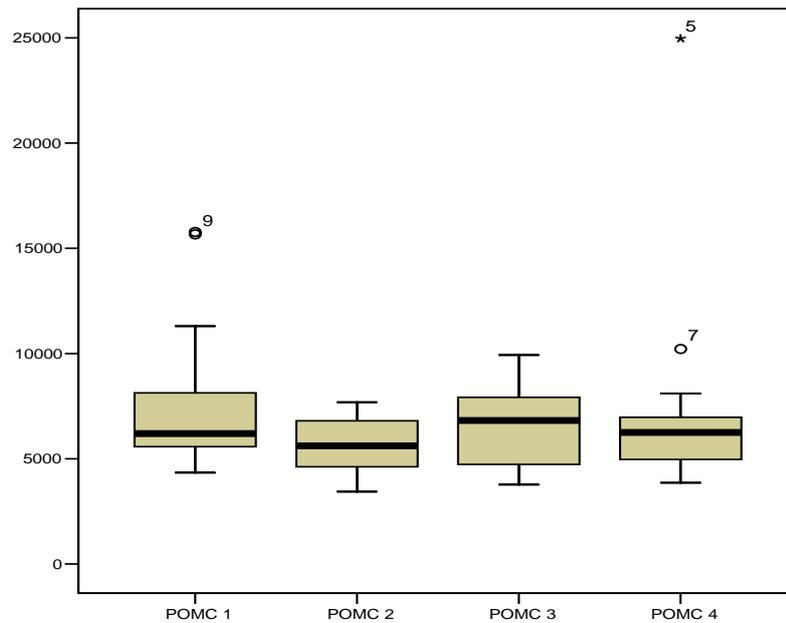
Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
POMC 4	,313	21	,000	,519	21	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors



La cuantificación de la expresión del gen POMC en las cuatro fases del estudio presenta este gráfico de distribución, con una significación estadística de $p = 0,016$.



Estudio de la POMC: medidas repetidas (Test de Friedman) Pruebas no paramétricas: Prueba de Friedman

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50 (Mediana)	75
POMC 1	20	7585,25	3265,361	4335	15775	5556,25	6197,50	8288,75
POMC 2	20	5637,25	1205,784	3435	7690	4531,25	5615,00	6883,75
POMC 3	20	6558,50	1878,365	3775	9925	4696,25	6820,00	7947,50
POMC 4	20	7136,25	4439,544	3860	24970	4952,50	6255,00	7077,50

Rangos

	Rango promedio
POMC 1	3,20
POMC 2	1,90
POMC 3	2,45
POMC 4	2,45

Estadísticos de contraste^a

N	20
Chi-cuadrado	10,260
gl	3
Sig. asintót.	,016

a. Prueba de Friedman

Estudio sin valores extremos “outliers” de POMC1 y POMC4

1.- POMC 1

El porcentaje de casos procesados sin los valores extremos es del 87% de los pacientes.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
POMC 1	20	87,0%	3	13,0%	23	100,0%

No tiene una distribución normal con valor de mediana de 6197 ciclos y amplitud intercuantil de 2225 ciclos

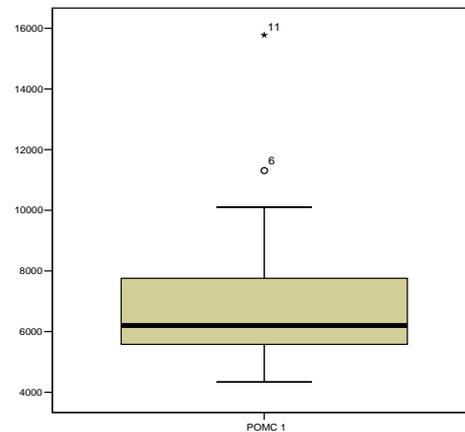
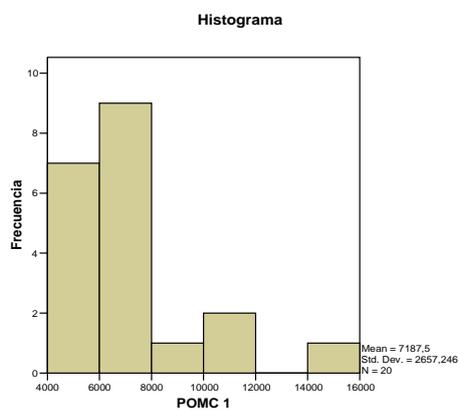
Descriptivos

			Estadístico	Error típ.
POMC 1	Media		7187,50	594,178
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	5943,87	
		Límite superior	8431,13	
	Media recortada al 5%		6868,89	
	Mediana		6197,50	
	Varianza		7060953,9	
	Desv. típ.		2657,246	
	Mínimo		4335	
	Máximo		15775	
	Rango		11440	
	Amplitud intercuantil		2225	
	Asimetría		2,075	,512
	Curtosis		5,071	,992

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
POMC 1	,208	20	,023	,791	20	,001

a. Corrección de la significación de Lilliefors



2.- POMC 4

La medición de POMC sin los valores extremos se realizó en el 82,6% de los pacientes.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
POMC 4	19	82,6%	4	17,4%	23	100,0%

Presenta una media de $5983,42 \pm 1122$ DE ciclos, valor estadísticamente significativo.

Descriptivos

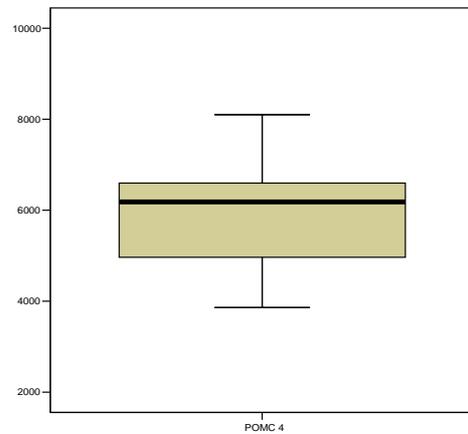
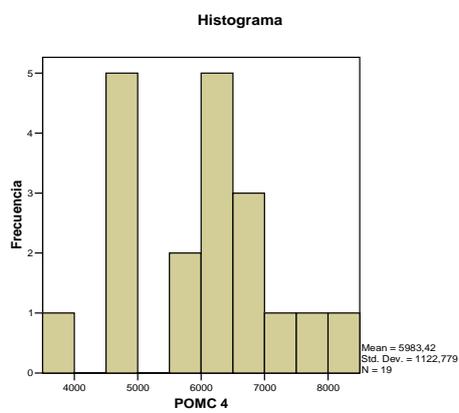
		Estadístico	Error típ.	
POMC 4	Media	5983,42	257,583	
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	5442,26	
		Límite superior	6524,58	
	Media recortada al 5%	5983,80		
	Mediana	6180,00		
	Varianza	1260633,5		
	Desv. típ.	1122,779		
	Mínimo	3860		
	Máximo	8100		
	Rango	4240		
	Amplitud intercuartil	1665		
	Asimetría	,061	,524	
	Curtosis	-,351	1,014	

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
POMC 4	,136	19	,200*	,972	19	,814

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

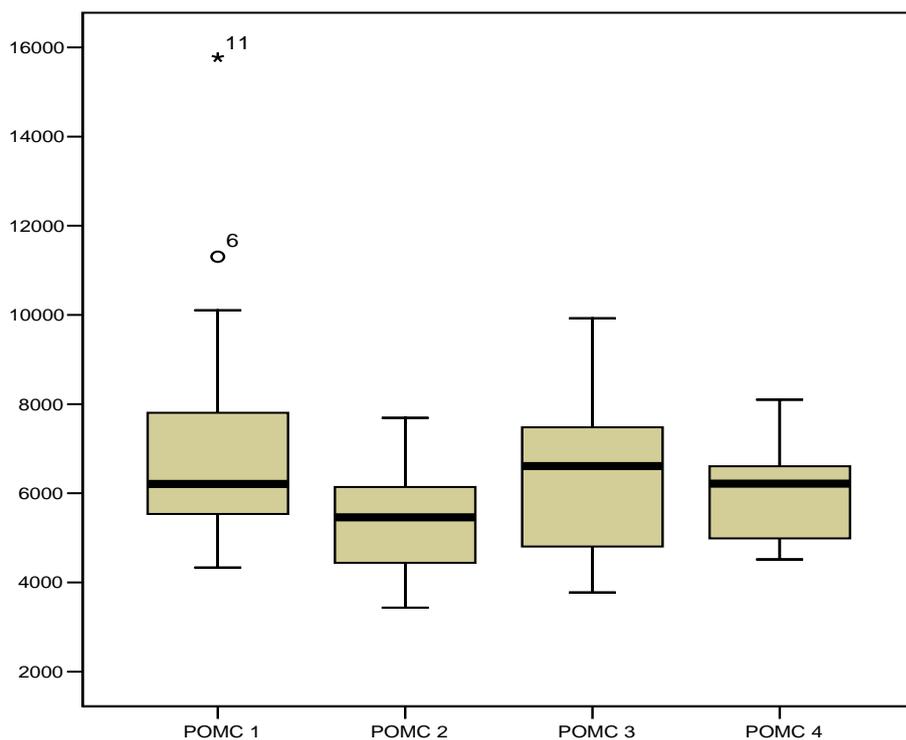


La cuantificación de POMC sin los “outliers” de POMC1 y POMC4 se procesó en el 73,9% de los pacientes.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
POMC 1	17	73,9%	6	26,1%	23	100,0%
POMC 2	17	73,9%	6	26,1%	23	100,0%
POMC 3	17	73,9%	6	26,1%	23	100,0%
POMC 4	17	73,9%	6	26,1%	23	100,0%

La grafica de distribución de la POMC en las cuatro fases del estudio, sin los valores extremos de POMC1 y POMC4, presenta una significación estadística de $p = 0,004$.



Pruebas no paramétricas: Prueba de Friedman

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50 (Mediana)	75
POMC 1	17	7283,82	2865,627	4335	15775	5500,00	6210,00	8127,50
POMC 2	17	5472,65	1218,487	3435	7690	4420,00	5460,00	6550,00
POMC 3	17	6377,06	1754,019	3775	9925	4687,50	6610,00	7672,50
POMC 4	17	6098,82	1058,595	4515	8100	4965,00	6215,00	6680,00

Rangos

	Rango promedio
POMC 1	3,41
POMC 2	1,82
POMC 3	2,41
POMC 4	2,35

Estadísticos de contraste^a

N	17
Chi-cuadrado	13,447
gl	3
Sig. asintót.	,004

a. Prueba de Friedman

POMC		C ₁	C ₁	C ₂	C ₂	C ₃	C ₃	MEDIA
Quantigene 1 seg. 485nm	CONTR OL	4530	5330	4825	5115	4970	4810	4930
	C1/2	4850	4620	4435	4765	4540	4690	4650
	C1/4	3700	4800	4110	4255	4225	4410	4250
	C1/8	3790	4550	4185	4215	4120	4160	4170
	C1/16	3300	3350	3690	3375	3015	3220	3325
	C1/32	1750	4320	2875	3165	3220	2880	3035
POMC		POMC	POM C	POM C	POM C	POM C	POMC	MEDIA
Q-RTPCR	CONTR OL	21,13	21,59	21,38	18,93	20,21	22,7	20,99
	C1/2	23,06	23,47	22,28	22,97	22,61	22,83	22,87
	C1/4	24,89	23,93	24,66	24,34	24,88	24,63	24,555
	C1/8	26,65	27,16	26,55	25,98	26,21	26,33	26,48
	C1/16	28,04	29,21	28,06	27,63	28,89	28,21	28,34
	POMC		GAPDH	GAPD H	GAPD H	GAPD H	GAPD H	GAPDH
Q-RTPCR	CONTR OL	18,85	18,7	18,32	17,66	17,83	17,57	18,155
	C1/2	20,86	21,63	21,18	21,61	21,12	20,65	21,175
	C1/4	23,89	25,17	24,12	24,87	24,65	24,75	24,575
	C1/8	26,67	27,12	27,91	28,14	27,41	27,02	27,37833
	C1/16	29,23	28,56	29,41	29,12	28,44	28,58	28,89

**MEDIAS DE 6
VALORACIONES**

	QUANTI GENE	ROC HE		RATIO P/G	Coef. Corr.
		POM C	GAPD H		
CONTR OL	4930	20,99	18,15	1,156155	r=0,99679
C1/2	4650	22,87	21,17	1,080047	Hasta
C1/4	4250	24,55	24,57	0,999186	C1/8
C1/8	4170	26,48	27,37	0,967199	r=0,80061
C1/16	3325	28,34	28,89	0,980962	Hasta
					C1/16

Valoración de la expresión del gen POMC por los diferentes métodos empleados en este trabajo en un banco de diluciones de donantes sanos. Estudio del coeficiente de correlación de Pearson.

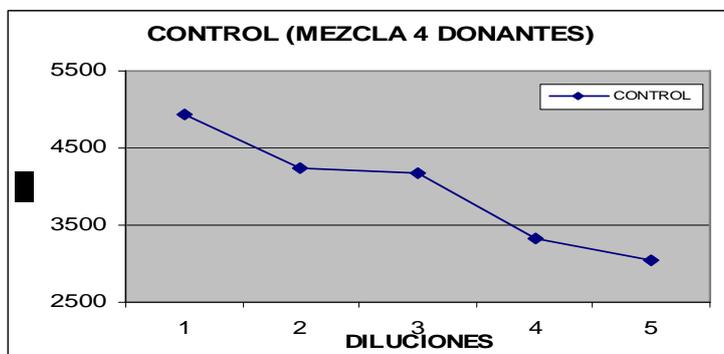


Grafico1. Curva de sensibilidad del método QuantiGene de Panomics. ARN de cuatro donantes sanos, se mezcló para soslayar variaciones individuales y se valoró la expresión de POMC de un banco de diluciones 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.

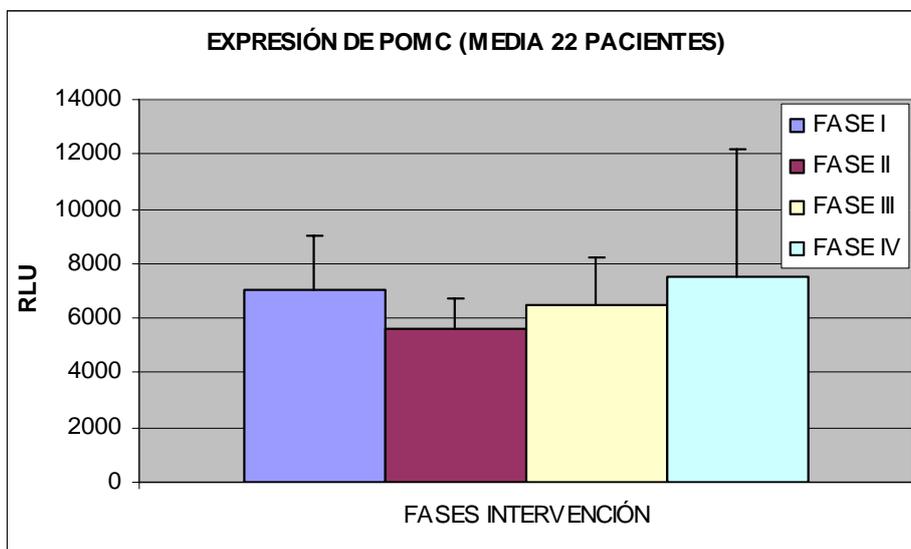


Grafico 2. Representación gráfica de la expresión de POMC, en 22 pacientes sometidos a intervención quirúrgica de prótesis de cadera, en cuatro distintas fases de su intervención (definidas en el apartado de Métodos). La valoración de la expresión del gen POMC, se realizó mediante el método QuantiGene de Panomics. RLU, son Unidades Relativas de Luminiscencia.

IV.3. NIVELES PLAMATICOS DE ACTH.

ACTH1

Los niveles plasmáticos de ACTH durante la fase preoperatorio, fase1, se miden en el 34,8% de los pacientes.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
ACTH 1	8	34,8%	15	65,2%	23	100,0%

El valor medio de ACTH1 en plasma es de $5,5 \pm 2,7$ DE pmol /L

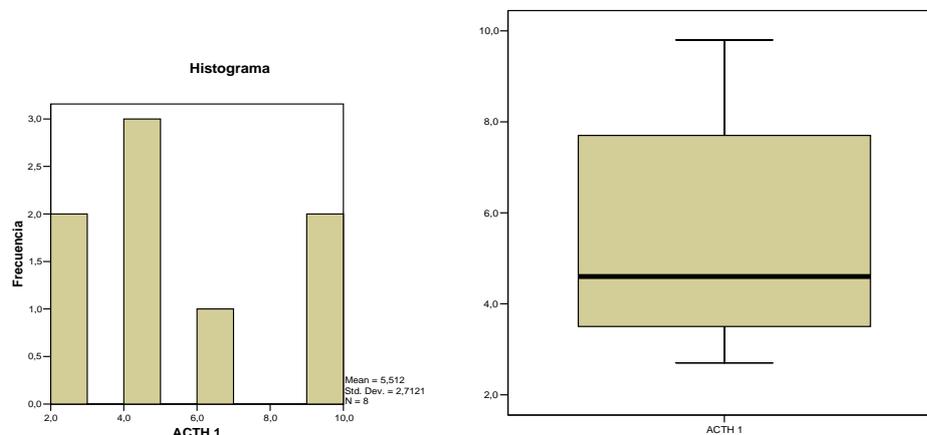
Descriptivos

			Estadístico	Error típ.
ACTH 1	Media		5,512	,9589
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	3,245	
		Límite superior	7,780	
	Media recortada al 5%		5,431	
	Mediana		4,600	
	Varianza		7,356	
	Desv. típ.		2,7121	
	Mínimo		2,7	
	Máximo		9,8	
	Rango		7,1	
	Amplitud intercuartil		5,3	
	Asimetría		,849	,752
	Curtosis		-,727	1,481

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ACTH 1	,243	8	,183	,867	8	,141

a. Corrección de la significación de Lilliefors



ACTH2

Durante la intervención quirúrgica, fase2, se miden los niveles plasmáticos de ACTH en el 34,8% de los pacientes.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
ACTH 2	8	34,8%	15	65,2%	23	100,0%

Presenta una Media de $2,76 \pm 1,51$ DE pmol/L, que es estadísticamente significativo.

Descriptivos

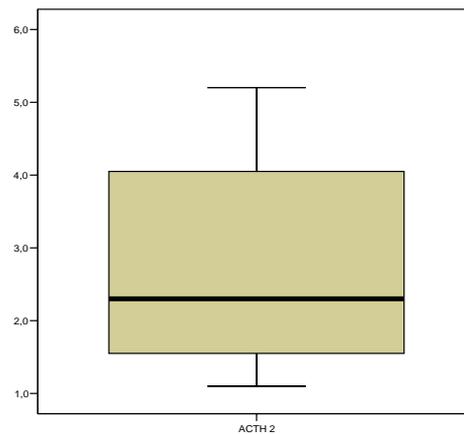
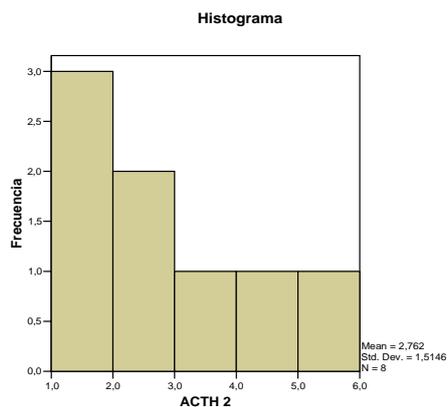
			Estadístico	Error típ.
ACTH 2	Media		2,762	,5355
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	1,496	
		Límite superior	4,029	
	Media recortada al 5%		2,719	
	Mediana		2,300	
	Varianza		2,294	
	Desv. típ.		1,5146	
	Mínimo		1,1	
	Máximo		5,2	
	Rango		4,1	
	Amplitud intercuartil		2,9	
	Asimetría		,605	,752
	Curtosis		-1,045	1,481

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ACTH 2	,220	8	,200*	,915	8	,392

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors



ACTH3

En el postoperatorio inmediato, fase 3, se miden los niveles plasmáticos de ACTH en el 39,1% de los pacientes.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
ACTH 3	9	39,1%	14	60,9%	23	100,0%

Los valores de ACTH3 no siguen una distribución normal, con una Mediana de 1,3 pmol/L, y una Amplitud intercuartil de 2,5 pmol/L.

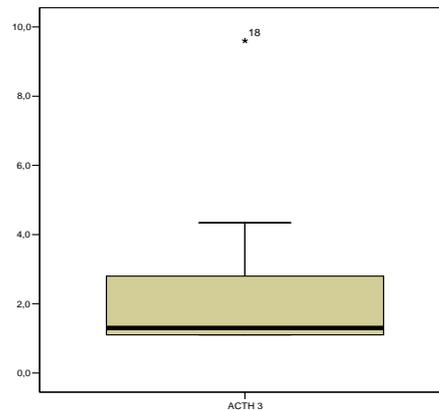
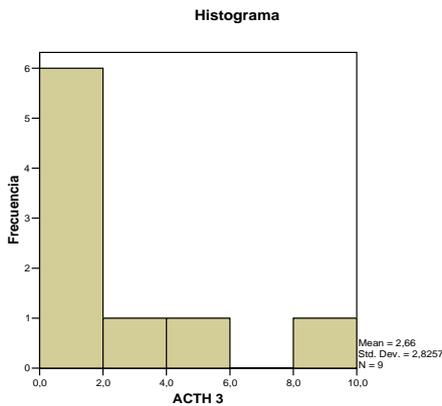
Descriptivos

		Estadístico	Error típ.
ACTH 3	Media	2,660	,9419
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior Límite superior	,488 4,832
	Media recortada al 5%	2,361	
	Mediana	1,300	
	Varianza	7,984	
	Desv. típ.	2,8257	
	Mínimo	1,1	
	Máximo	9,6	
	Rango	8,5	
	Amplitud intercuartil	2,5	
	Asimetría	2,279	,717
	Curtosis	5,327	1,400

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ACTH 3	,339	9	,004	,643	9	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors



ACTH4

A las 48h de la intervención quirúrgica en el postoperatorio tardío, fase 4, los niveles plasmáticos de ACTH se midieron en el 43,5% de los pacientes.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
ACTH 4	10	43,5%	13	56,5%	23	100,0%

El valor de la Media es de $2,96 \pm 1,68$ DE pmol/L, que es estadísticamente significativo.

Descriptivos

			Estadístico	Error típ.
ACTH 4	Media		2,960	,5313
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	1,758	
		Límite superior	4,162	
	Media recortada al 5%		2,822	
	Mediana		2,550	
	Varianza		2,823	
	Dev. típ.		1,6801	
	Mínimo		1,3	
	Máximo		7,1	
	Rango		5,8	
	Amplitud intercuartil		1,7	
	Asimetría		1,854	,687
	Curtosis		4,123	1,334

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ACTH 4	,214	10	,200*	,826	10	,030

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

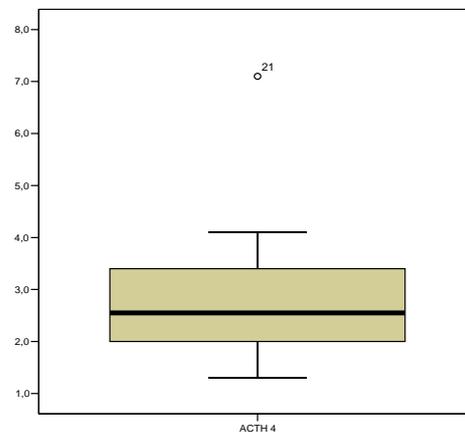
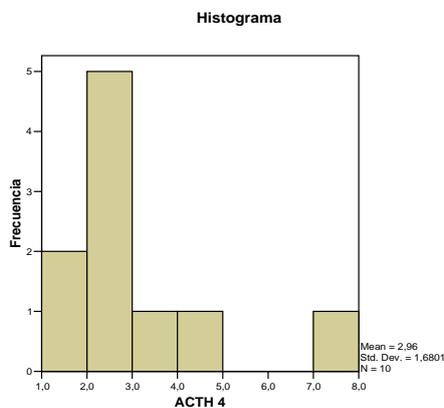
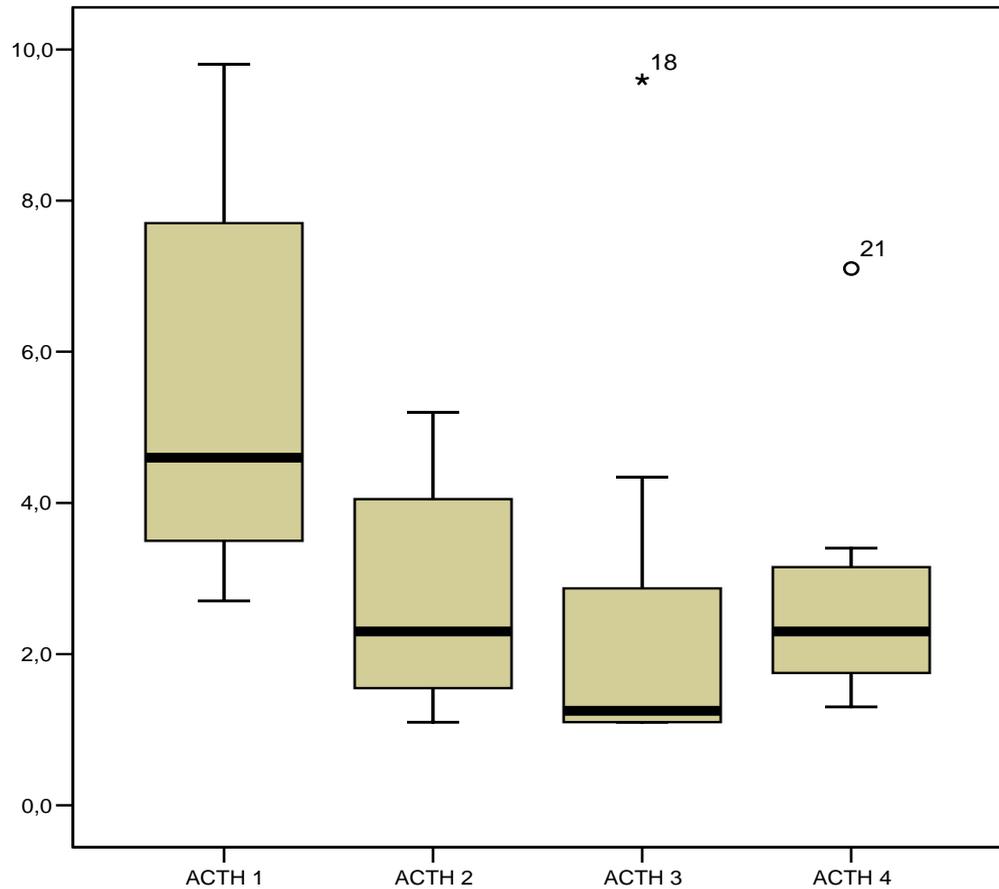


Grafico de distribución de la medición de los niveles plasmáticos de ACTH en las cuatro fases del estudio-
 Los valores encontrados son estadísticamente significativos con $p = 0,010$



**Estudio de la ACTH: medidas repetidas (Test de Friedman)
 Pruebas no paramétricas: Prueba de Friedman**

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50 (Mediana)	75
ACTH 1	8	5,513	2,7121	2,7	9,8	3,200	4,600	8,500
ACTH 2	8	2,763	1,5146	1,1	5,2	1,375	2,300	4,275
ACTH 3	8	2,643	3,0202	1,1	9,6	1,100	1,250	3,605
ACTH 4	8	2,850	1,8493	1,3	7,1	1,625	2,300	3,275

Rangos

	Rango promedio
ACTH 1	3,75
ACTH 2	2,25
ACTH 3	1,69
ACTH 4	2,31

Estadísticos de contraste^a

N	8
Chi-cuadrado	11,423
gl	3
Sig. asintót.	,010

a. Prueba de Friedman

Correlaciones entre variables cuantitativas

Existe correlación significativa entre POMC2 y POMC3, y también hay correlación significativa entre ACTH1 y ACTH2.

		Correlaciones								
		POMC 1	POMC 2	POMC 3	POMC 4	ACTH 1	ACTH 2	ACTH 3	ACTH 4	Edad
POMC 1	Correlación de Pearson	1	,247	,179	-,171	,702	,712	-,339	,588	-,248
	Sig. (bilateral)		,295	,438	,460	,079	,073	,412	,125	,279
	N	21	20	21	21	7	7	8	8	21
POMC 2	Correlación de Pearson	,247	1	,577**	,248	,685	,666	,162	,528	,123
	Sig. (bilateral)	,295		,008	,292	,089	,103	,729	,223	,607
	N	20	20	20	20	7	7	7	7	20
POMC 3	Correlación de Pearson	,179	,577**	1	,500*	,298	,341	-,503	,316	-,052
	Sig. (bilateral)	,438	,008		,021	,516	,455	,203	,446	,823
	N	21	20	21	21	7	7	8	8	21
POMC 4	Correlación de Pearson	-,171	,248	,500*	1	,301	,378	-,578	,566	-,130
	Sig. (bilateral)	,460	,292	,021		,512	,403	,134	,143	,574
	N	21	20	21	21	7	7	8	8	21
ACTH 1	Correlación de Pearson	,702	,685	,298	,301	1	,985**	,082	,766*	-,727*
	Sig. (bilateral)	,079	,089	,516	,512		,000	,846	,027	,041
	N	7	7	7	7	8	8	8	8	8
ACTH 2	Correlación de Pearson	,712	,666	,341	,378	,985**	1	,019	,761*	-,694
	Sig. (bilateral)	,073	,103	,455	,403	,000		,964	,028	,056
	N	7	7	7	7	8	8	8	8	8
ACTH 3	Correlación de Pearson	-,339	,162	-,503	-,578	,082	,019	1	-,139	-,039
	Sig. (bilateral)	,412	,729	,203	,134	,846	,964		,721	,920
	N	8	7	8	8	8	8	9	9	9
ACTH 4	Correlación de Pearson	,588	,528	,316	,566	,766*	,761*	-,139	1	-,405
	Sig. (bilateral)	,125	,223	,446	,143	,027	,028	,721		,246
	N	8	7	8	8	8	8	9	10	10
Edad	Correlación de Pearson	-,248	,123	-,052	-,130	-,727*	-,694	-,039	-,405	1
	Sig. (bilateral)	,279	,607	,823	,574	,041	,056	,920	,246	
	N	21	20	21	21	8	8	9	10	23

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

Correlaciones no paramétricas

Hay correlación significativa entre POMC2 y POMC3, y entre ACTH1 y ACTH2.

		Correlaciones									
		POMC 1	POMC 2	POMC 3	POMC 4	ACTH 1	ACTH 2	ACTH 3	ACTH 4	Edad	
Rho de Spearman	POMC 1	Coefficiente de correlación	1,000	,528*	,465*	-,113	,500	,643	-,073	,714*	-,130
		Sig. (bilateral)	.	,017	,034	,626	,253	,119	,863	,047	,574
		N	21	20	21	21	7	7	8	8	21
POMC 2	POMC 2	Coefficiente de correlación	,528*	1,000	,565**	,165	,643	,714	,111	,893**	,114
		Sig. (bilateral)	,017	.	,009	,486	,119	,071	,812	,007	,631
		N	20	20	20	20	7	7	7	7	20
POMC 3	POMC 3	Coefficiente de correlación	,465*	,565**	1,000	,479*	,286	,500	-,293	,548	-,036
		Sig. (bilateral)	,034	,009	.	,028	,535	,253	,482	,160	,875
		N	21	20	21	21	7	7	8	8	21
POMC 4	POMC 4	Coefficiente de correlación	-,113	,165	,479*	1,000	,286	,464	-,756*	,238	-,048
		Sig. (bilateral)	,626	,486	,028	.	,535	,294	,030	,570	,838
		N	21	20	21	21	7	7	8	8	21
ACTH 1	ACTH 1	Coefficiente de correlación	,500	,643	,286	,286	1,000	,976**	,146	,571	-,683
		Sig. (bilateral)	,253	,119	,535	,535	.	,000	,729	,139	,062
		N	7	7	7	7	8	8	8	8	8
ACTH 2	ACTH 2	Coefficiente de correlación	,643	,714	,500	,464	,976**	1,000	,000	,619	-,683
		Sig. (bilateral)	,119	,071	,253	,294	,000	.	1,000	,102	,062
		N	7	7	7	7	8	8	8	8	8
ACTH 3	ACTH 3	Coefficiente de correlación	-,073	,111	-,293	-,756*	,146	,000	1,000	,068	,017
		Sig. (bilateral)	,863	,812	,482	,030	,729	1,000	.	,862	,965
		N	8	7	8	8	8	8	9	9	9
ACTH 4	ACTH 4	Coefficiente de correlación	,714*	,893**	,548	,238	,571	,619	,068	1,000	-,275
		Sig. (bilateral)	,047	,007	,160	,570	,139	,102	,862	.	,442
		N	8	7	8	8	8	8	9	10	10
Edad	Edad	Coefficiente de correlación	-,130	,114	-,036	-,048	-,683	-,683	,017	-,275	1,000
		Sig. (bilateral)	,574	,631	,875	,838	,062	,062	,965	,442	.
		N	21	20	21	21	8	8	9	10	23

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Estudio sin los valores extremos “ outliers” de la ACTH 3 i 4:

1.- ACTH 3

La medición de los niveles plasmáticos de ACTH, en la fase 3, sin los valores extremos se realizó en el 34,8% de los pacientes.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
ACTH 3	8	34,8%	15	65,2%	23	100,0%

Los valores de ACTH3 no presentan una distribución normal, con Mediana 1,25 pmol/L y amplitud intercuantil de 1,3 pmol/L

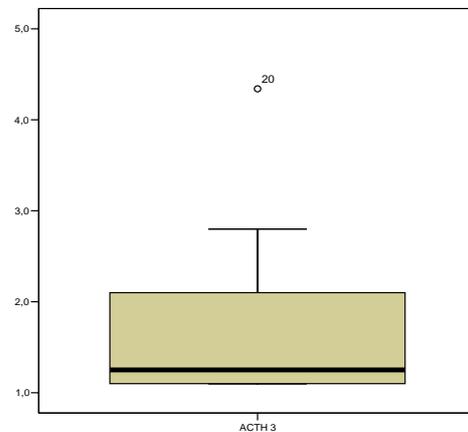
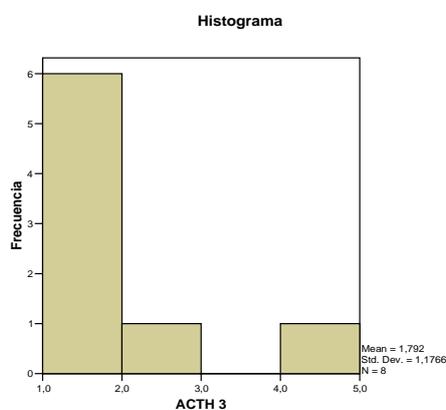
Descriptivos

			Estadístico	Error típ.
ACTH 3	Media		1,793	,4160
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,809	
		Límite superior	2,776	
	Media recortada al 5%		1,689	
	Mediana		1,250	
	Varianza		1,384	
	Desv. típ.		1,1766	
	Mínimo		1,1	
	Máximo		4,3	
	Rango		3,2	
	Amplitud intercuartil		1,3	
	Asimetría		1,891	,752
	Curtosis		2,978	1,481

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ACTH 3	,381	8	,001	,674	8	,001

a. Corrección de la significación de Lilliefors



2.- ACTH 4

La valoración de ACTH en la fase 4 sin los “outliers” o valores extremos se realiza en 9 pacientes, que corresponde al 39,1% de los casos.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
ACTH 4	9	39,1%	14	60,9%	23	100,0%

El valor de la media es de $2,5 \pm 0,89$ DE pmol/L con significación estadística.

Descriptivos

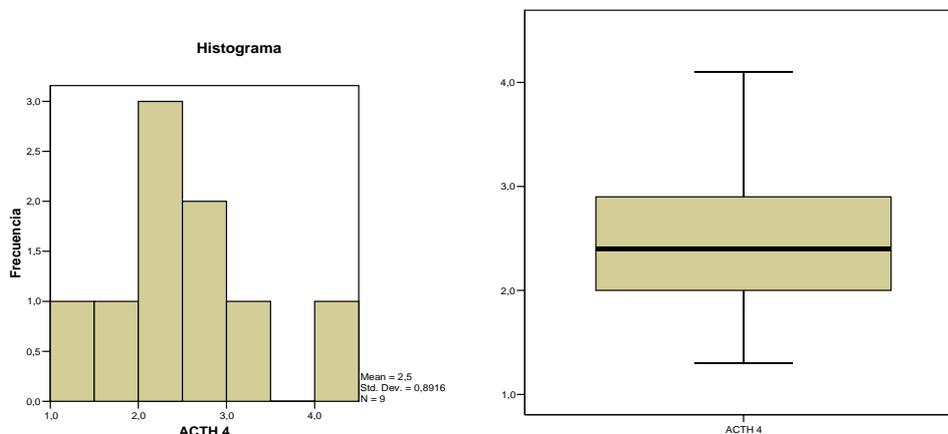
			Estadístico	Error típ.
ACTH 4	Media		2,500	,2972
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	1,815	
		Límite superior	3,185	
	Media recortada al 5%		2,478	
	Mediana		2,400	
	Varianza		,795	
	Desv. típ.		,8916	
	Mínimo		1,3	
	Máximo		4,1	
	Rango		2,8	
	Amplitud intercuartil		1,4	
	Asimetría		,457	,717
	Curtosis		-,172	1,400

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ACTH 4	,105	9	,200*	,975	9	,934

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

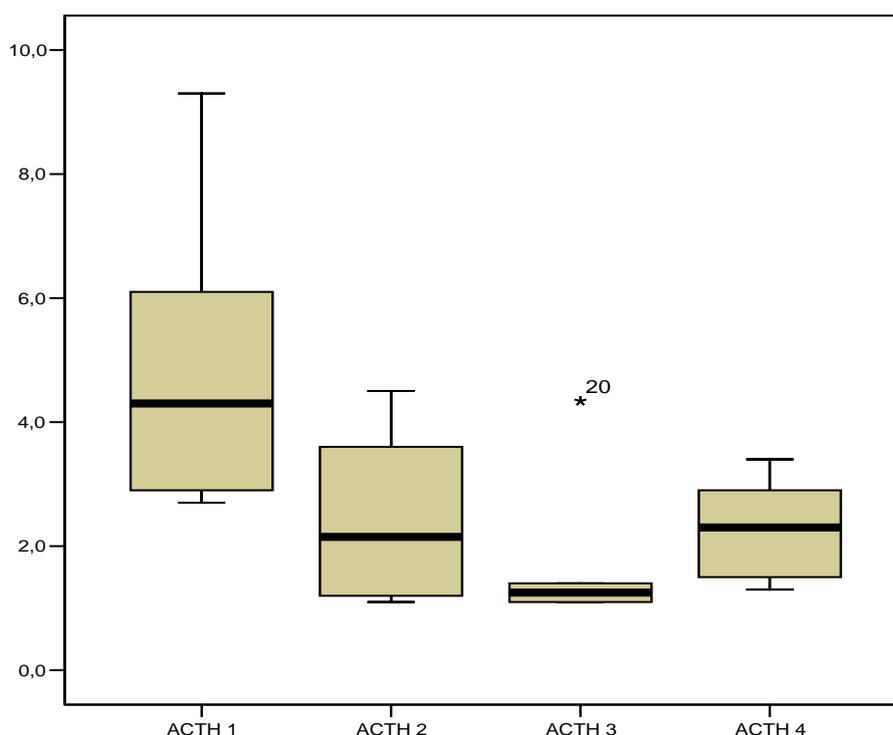


El estudio de ACTH sin los valores “outliers” de ACTH3 y ACTH4 se realiza en el 26,1% de los pacientes.

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
ACTH 1	6	26,1%	17	73,9%	23	100,0%
ACTH 2	6	26,1%	17	73,9%	23	100,0%
ACTH 3	6	26,1%	17	73,9%	23	100,0%
ACTH 4	6	26,1%	17	73,9%	23	100,0%

Gráfica de distribución de ACTH en las cuatro fases, sin los valores “outliers” de ACTH3 y ACTH4, presenta una significación estadística de $p = 0,011$



Pruebas no paramétricas: Prueba de Friedman

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50 (Mediana)	75
ACTH 1	6	4,933	2,4671	2,7	9,3	2,850	4,300	6,900
ACTH 2	6	2,450	1,3576	1,1	4,5	1,175	2,150	3,825
ACTH 3	6	1,740	1,2791	1,1	4,3	1,100	1,250	2,135
ACTH 4	6	2,283	,8035	1,3	3,4	1,450	2,300	3,025

Rangos

	Rango promedio
ACTH 1	3,83
ACTH 2	2,33
ACTH 3	1,42
ACTH 4	2,42

Estadísticos de contraste^a

N	6
Chi-cuadrado	11,121
gl	3
Sig. asintót.	,011

a. Prueba de Friedman

Correlaciones entre variables cuantitativas.

Existe correlación significativa entre POMC2 / POMC3 y entre ACTH1 /ACTH2

Correlaciones

		POMC 1	POMC 2	POMC 3	POMC 4	ACTH 1	ACTH 2	ACTH 3	ACTH 4	Edad
POMC 1	Correlación de Pearson	1	,267	,398	,122	,702	,712	,637	,668	-,256
	Sig. (bilateral)		,269	,082	,630	,079	,073	,124	,101	,275
	N	20	19	20	18	7	7	7	7	20
POMC 2	Correlación de Pearson	,267	1	,577**	-,024	,685	,666	,727	,945**	,123
	Sig. (bilateral)	,269		,008	,924	,089	,103	,101	,004	,607
	N	19	20	20	18	7	7	6	6	20
POMC 3	Correlación de Pearson	,398	,577**	1	,275	,298	,341	,125	,381	-,052
	Sig. (bilateral)	,082	,008		,255	,516	,455	,789	,400	,823
	N	20	20	21	19	7	7	7	7	21
POMC 4	Correlación de Pearson	,122	-,024	,275	1	,301	,378	-,378	,065	,197
	Sig. (bilateral)	,630	,924	,255		,512	,403	,404	,889	,418
	N	18	18	19	19	7	7	7	7	19
ACTH 1	Correlación de Pearson	,702	,685	,298	,301	1	,985**	,537	,604	-,727*
	Sig. (bilateral)	,079	,089	,516	,512		,000	,214	,150	,041
	N	7	7	7	7	8	8	7	7	8
ACTH 2	Correlación de Pearson	,712	,666	,341	,378	,985**	1	,439	,556	-,694
	Sig. (bilateral)	,073	,103	,455	,403	,000		,324	,195	,056
	N	7	7	7	7	8	8	7	7	8
ACTH 3	Correlación de Pearson	,637	,727	,125	-,378	,537	,439	1	,708	-,413
	Sig. (bilateral)	,124	,101	,789	,404	,214	,324		,075	,310
	N	7	6	7	7	7	7	8	7	8
ACTH 4	Correlación de Pearson	,668	,945**	,381	,065	,604	,556	,708	1	-,252
	Sig. (bilateral)	,101	,004	,400	,889	,150	,195	,075		,512
	N	7	6	7	7	7	7	7	9	9
Edad	Correlación de Pearson	-,256	,123	-,052	,197	-,727*	-,694	-,413	-,252	1
	Sig. (bilateral)	,275	,607	,823	,418	,041	,056	,310	,512	
	N	20	20	21	19	8	8	8	9	23

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Correlaciones no paramétricas

Existe correlación significativa entre : POMC1 / POMC3. POMC2/POMC3 y ACTH1 / ACTH2

Correlaciones

		POMC 1	POMC 2	POMC 3	POMC 4	ACTH 1	ACTH 2	ACTH 3	ACTH 4	Edad	
Rho de Spearman	POMC 1	Coefficiente de correlación	1,000	,549*	,582**	,069	,500	,643	,408	,643	-,112
		Sig. (bilateral)	.	,015	,007	,785	,253	,119	,364	,119	,640
		N	20	19	20	18	7	7	7	7	20
POMC 2	POMC 2	Coefficiente de correlación	,549*	1,000	,565**	-,036	,643	,714	,334	,886*	,114
		Sig. (bilateral)	,015	.	,009	,887	,119	,071	,518	,019	,631
		N	19	20	20	18	7	7	6	6	20
POMC 3	POMC 3	Coefficiente de correlación	,582**	,565**	1,000	,326	,286	,500	,074	,536	-,036
		Sig. (bilateral)	,007	,009	.	,173	,535	,253	,875	,215	,875
		N	20	20	21	19	7	7	7	7	21
POMC 4	POMC 4	Coefficiente de correlación	,069	-,036	,326	1,000	,286	,464	-,630	-,143	,040
		Sig. (bilateral)	,785	,887	,173	.	,535	,294	,129	,760	,872
		N	18	18	19	19	7	7	7	7	19
ACTH 1	ACTH 1	Coefficiente de correlación	,500	,643	,286	,286	1,000	,976**	,037	,357	-,683
		Sig. (bilateral)	,253	,119	,535	,535	.	,000	,937	,432	,062
		N	7	7	7	7	8	8	7	7	8
ACTH 2	ACTH 2	Coefficiente de correlación	,643	,714	,500	,464	,976**	1,000	,037	,429	-,683
		Sig. (bilateral)	,119	,071	,253	,294	,000	.	,937	,337	,062
		N	7	7	7	7	8	8	7	7	8
ACTH 3	ACTH 3	Coefficiente de correlación	,408	,334	,074	-,630	,037	,037	1,000	,685	-,086
		Sig. (bilateral)	,364	,518	,875	,129	,937	,937	.	,090	,840
		N	7	6	7	7	7	7	8	7	8
ACTH 4	ACTH 4	Coefficiente de correlación	,643	,886*	,536	-,143	,357	,429	,685	1,000	-,165
		Sig. (bilateral)	,119	,019	,215	,760	,432	,337	,090	.	,671
		N	7	6	7	7	7	7	7	9	9
Edad	Edad	Coefficiente de correlación	-,112	,114	-,036	,040	-,683	-,683	-,086	-,165	1,000
		Sig. (bilateral)	,640	,631	,875	,872	,062	,062	,840	,671	.
		N	20	20	21	19	8	8	8	9	23

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla I. Valoración de los niveles plasmáticos de ACTH en 8 pacientes en las distintas fases del estudio..

fase I	fase II	fase III	fase IV
2,9	<1,2	<1,2	1,3
2,7	<1,11	1,3	2,9
4,1	1,9	<1,11	1,5
4,7	2,2	9,6	2
9,3	4,5	4,34	3,4
		2,8	4,1
9,8	5,2	<1,11	7,1
4,5	2,4	<1,11	2,4
6,1	3,6	1,4	2,2

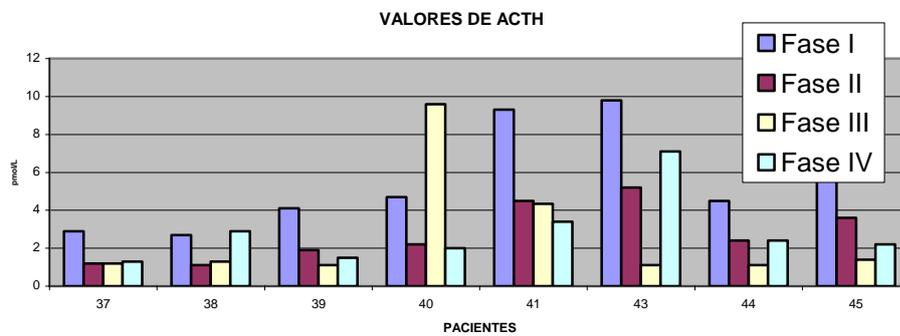


Figura 3. Representación gráfica de los niveles plasmáticos de ACTH en cada paciente durante las cuatro fases del estudio.

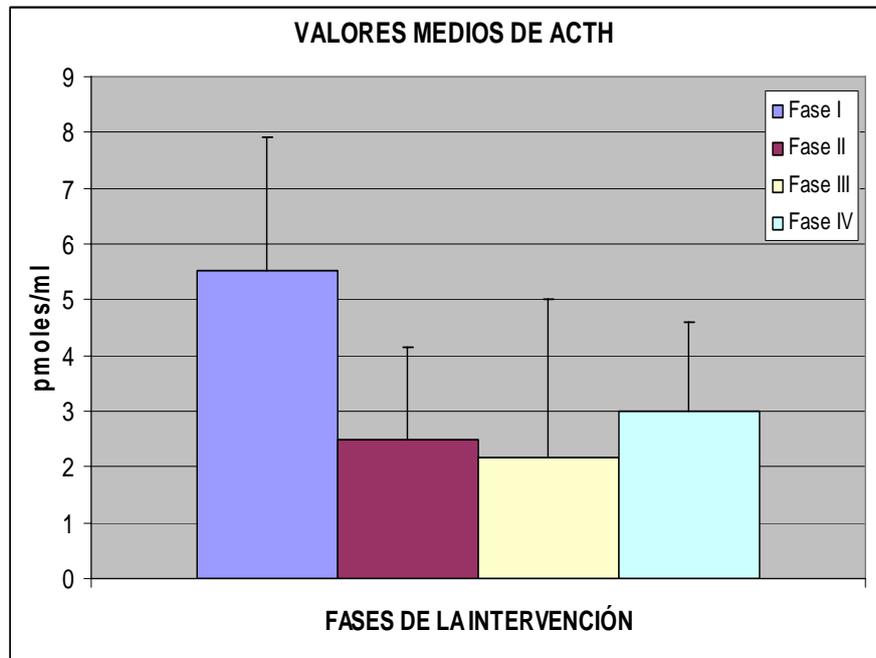


Figura 4. Representación gráfica de los valores medios de los niveles plasmáticos de ACTH en las diferentes fases del estudio.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS EN CADA UNA DE LAS FASES.

Fase 1: Preoperatorio.

EL valor de POMC1 no sigue una distribución normal, mediana 6210 ciclos y amplitud intercuartil 2550 ciclos, rango promedio (RP) 3,20

Los niveles plasmáticos de ACTH1 tienen un valor medio de $5,5 \pm 2,7$ DE pmol / L. Rango promedio (RP) 3,75

Fase 2: Intraquirurgico.

Después de la realización de la anestesia subaracnoidea y sedación, la expresión de RNAm de POMC en linfocitos periféricos descienden en todos los pacientes y los niveles plasmáticos de ACTH también disminuyen en los pacientes donde fue medido.

POMC2 valor medio $5637,25 \pm 1205,78$ ciclos, RP 1,90

ACTH2 valor medio $2,762 \pm 1,5146$ pmol / L, RP 2,25

Ambos valores son estadísticamente significativos.

Lo que más llama la atención de nuestros resultados es el descenso acusado en todos los pacientes de la expresión del gen POMC y los niveles plasmáticos de ACTH, en el intervalo de tiempo comprendido entre la punción del catéter intravenoso (1ª muestra, fase I) y la punción de la vía venosa central por vena basílica (2ª muestra, fase II), en este intervalo ocurre :

Punción intradural con anestésico local mas Metadona

Sedación

Incisión quirúrgica.

Este hallazgo contrasta con otros estudios donde, aunque en menor medida en anestesia raquídea versus anestesia general, existe aumento de la respuesta endocrino-metabólica durante el comienzo de la cirugía. ^(7- 10)

Fase 3: Postoperatorio inmediato.

En la sala de reanimación posquirúrgica al revertirse el bloqueo sensitivo- motor, los valores de ACTH continúan en descenso, en algunos pacientes son casi indetectables, mientras que la expresión de POMC aumenta hasta valores próximos a los de la Fase 1

POMC3 valor medio 6558 ± 1878 ciclos, RP 2,45

ACTH3 mediana 1,3, A intercuartil 2,5, RP 1,69

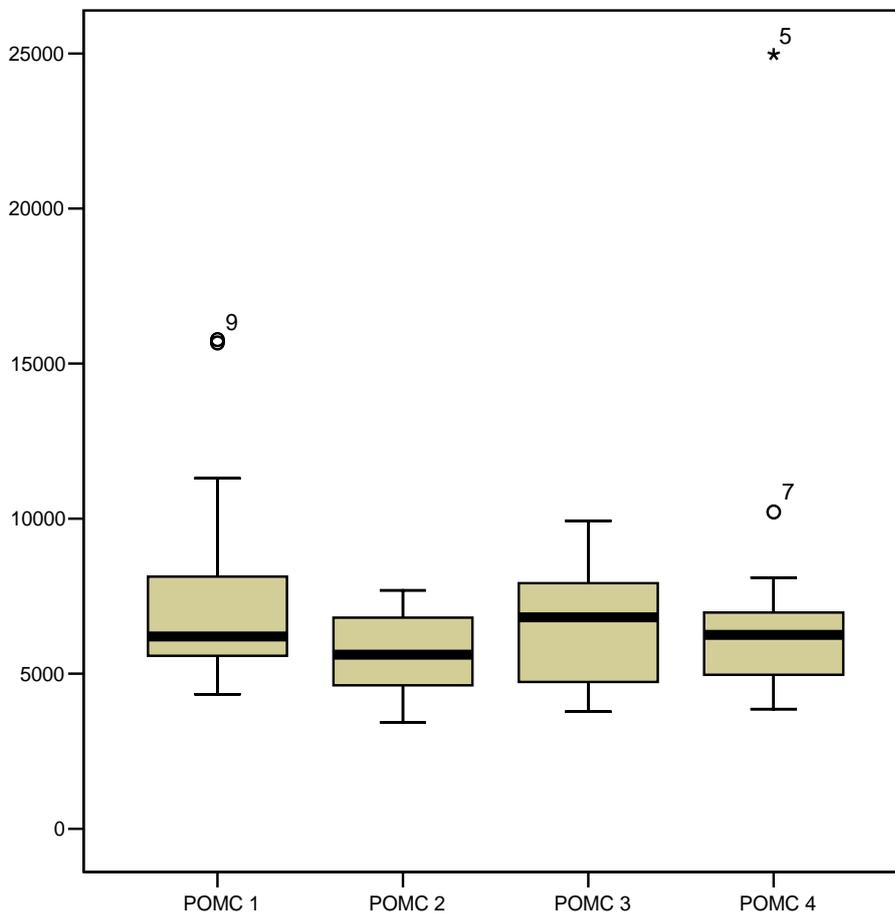
Fase 4: Postoperatorio tardío.

A las 48h de la intervención quirúrgica, a las 8h am, aumentan los niveles plasmáticos de ACTH, mientras que la expresión de POMC se mantiene en valores similares a la Fase 3. La medición de POMC en la Fase 4, si exceptuamos los valores “outliers”, tiende a valores superiores a la Fase 1.

POMC 4 mediana de 6215, A intercuartil 2005 ciclos, RP 2,45

ACTH 4 valor medio $2,85 \pm 1,84$ DE pmol / L, RP 2,31.

Grafico 1. Distribución de la cuantificación de la expresión del gen POMC en las cuatro fases del estudio, valores estadísticamente significativos con $p = 0,016$.



**Estudio de la POMC: medidas repetidas (Test de Friedman)
Pruebas no paramétricas: Prueba de Friedman**

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50 (Mediana)	75
POMC 1	20	7585,25	3265,361	4335	15775	5556,25	6197,50	8288,75
POMC 2	20	5637,25	1205,784	3435	7690	4531,25	5615,00	6883,75
POMC 3	20	6558,50	1878,365	3775	9925	4696,25	6820,00	7947,50
POMC 4	20	7136,25	4439,544	3860	24970	4952,50	6255,00	7077,50

Rangos

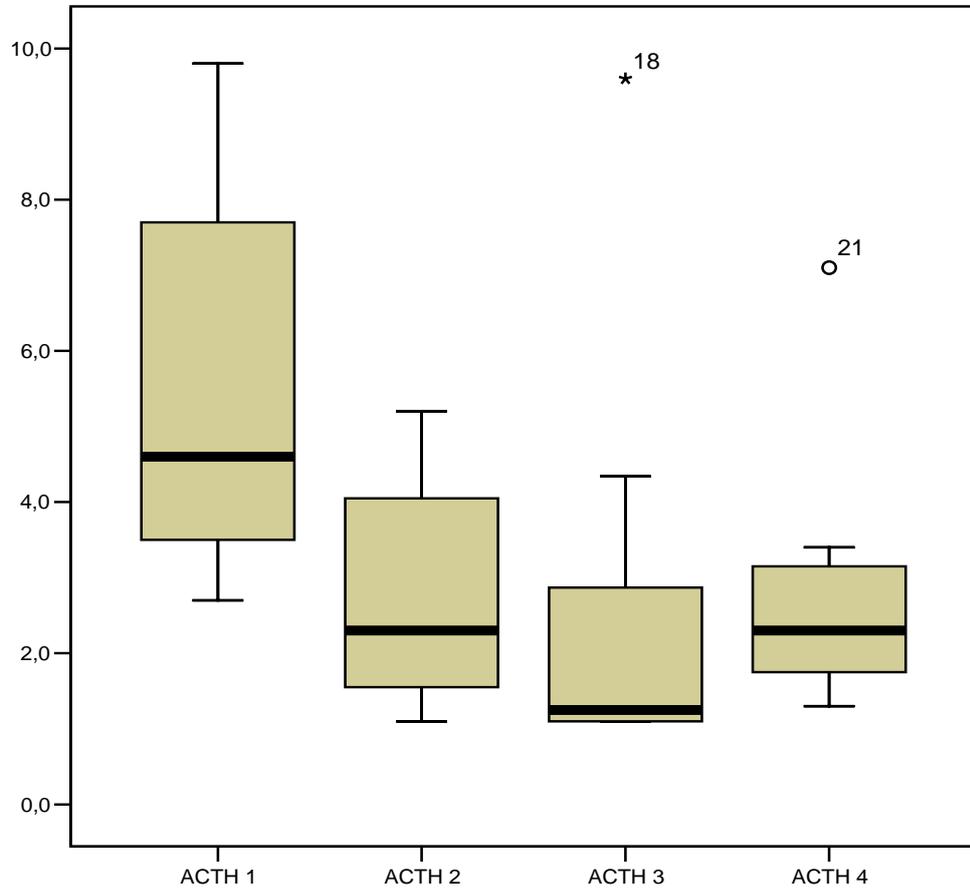
	Rango promedio
POMC 1	3,20
POMC 2	1,90
POMC 3	2,45
POMC 4	2,45

Estadísticos de contraste^a

N	20
Chi-cuadrado	10,260
gl	3
Sig. asintót.	,016

a. Prueba de Friedman

Gráfico 2. Distribución de la medición de los niveles plasmáticos de ACTH en las cuatro fases del estudio. Los valores encontrados son estadísticamente significativos con $p = 0,010$



**Estudio de la ACTH: medidas repetidas (Test de Friedman)
Pruebas no paramétricas: Prueba de Friedman**

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50 (Mediana)	75
ACTH 1	8	5,513	2,7121	2,7	9,8	3,200	4,600	8,500
ACTH 2	8	2,763	1,5146	1,1	5,2	1,375	2,300	4,275
ACTH 3	8	2,643	3,0202	1,1	9,6	1,100	1,250	3,605
ACTH 4	8	2,850	1,8493	1,3	7,1	1,625	2,300	3,275

Rangos

	Rango promedio
ACTH 1	3,75
ACTH 2	2,25
ACTH 3	1,69
ACTH 4	2,31

Estadísticos de contraste^a

N	8
Chi-cuadrado	11,423
gl	3
Sig. asintót.	,010

a. Prueba de Friedman

Discusión

VI. DISCUSIÓN

Los procedimientos quirúrgicos, tanto por la agresión tisular que se produce como por la técnica anestésica, evocan una respuesta neuroendocrina que produce la movilización de sustratos, un cambio en el metabolismo hacia un catabolismo con un balance nitrogenado negativo y retención de agua y sal. La magnitud de esta respuesta es proporcional a la intensidad del trauma quirúrgico. La agresión quirúrgica del organismo desencadena una serie de respuestas metabólicas, hormonales, inmunológicas y hemodinámicas caracterizadas por una situación de hipermetabolismo en la que hay una alteración de la homeostasis proteica (aumento del catabolismo proteico con un balance nitrogenado negativo), alteración del metabolismo de los carbohidratos (aumento de la gluconeogénesis y disminución de la glucólisis, que llevan a una hiperglucemia), incremento de la lipólisis (con disminución de la lipogénesis) y retención de sodio y agua⁽⁸⁵⁾. La magnitud de estos cambios es proporcional a la intensidad de la lesión quirúrgica⁽⁸⁵⁻⁸⁹⁾.

La traducción neuroendocrina de la agresión quirúrgica es la elevación de los niveles plasmáticos de las hormonas contra reguladoras (glucagón, cortisol, y catecolaminas), así como de la hormona de crecimiento, aldosterona, ACTH, prolactina y vasopresina, elevaciones que representan la respuesta hipotalámica a los impulsos nociceptivos aferentes desde la zona quirúrgica y probablemente a una serie de mecanismos humorales todavía por dilucidar⁽⁹⁰⁾.

Los niveles hormonales y de sustratos circulantes constituyen para todos los autores unos indicadores directos del estrés, mientras que los cambios hemodinámicos se consideran los indicadores indirectos por excelencia de esta respuesta.

Nuestros resultados parecen demostrar que la síntesis de POMC existe de forma basal en células mononucleadas de sangre periférica, por lo que, muy posiblemente, la liberación de mediadores neurotransmisores o moléculas de reacción de fase aguda en situaciones de estrés perioperatorio podrían tener un reflejo periférico induciendo la síntesis y liberación de ACTH, MSH y endorfinas. Desafortunadamente no encontramos la manera de contrastar nuestros resultados, pues el efecto de las diversas técnicas anestésicas sobre la respuesta inmune no ha sido evaluada, según han demostrado diferentes autores⁽⁹¹⁾. En el presente trabajo se estudió el mismo trauma quirúrgico y bajo la misma técnica anestésica.

El patrón de los valores de POMC es similar al de la medición de ACTH, lo que demostraría que ambos están sometidos a las mismas influencias o factores en su regulación, el desfase se puede explicar por el hecho de que la medida de ACTH es de una proteína plasmática, con control del eje hipotálamo-hipofisario, lo que implica un procesamiento que requiere un cierto tiempo, mientras que la POMC es una medida directa del RNA.

Los valores de RNA fueron sumamente variables, debido tanto a la calidad de las muestras (tiempo transcurrido entre la extracción sanguínea y la extracción del RNA), como a las condiciones de almacenamiento hasta su procesamiento (frío, respecto temperatura ambiente), y el volumen de sangre extraído. Imponderables todos ellos, que deben ser tenidos en cuenta en el ámbito en que el trabajo se realiza (quirófano, sala de reanimación, etc.), por lo que es necesario la creación de circuitos adecuados para el manejo de este tipo de muestras, que posiblemente cada vez tengan mayor importancia en la práctica médica.

Sin embargo, la precisa valoración del contenido de RNA de las muestras por métodos espectrométricos, permitió igualar, salvo contadas excepciones, las concentraciones del material sobre el que se realizaba la valoración de la expresión genética de la POMC, de tal manera, que las diferencias iniciales de contenido, no influyeran para el análisis de los valores relativos de las moléculas de POMC presentes en las muestras.

A lo largo de este trabajo se han empleado fundamentalmente dos métodos para el estudio de la expresión génica de la POMC en células mononucleadas de sangre periférica: La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real de ROCHE y de Applied Biosystems (que a pesar de las diferencias su base metodológica es la misma) y el sistema QuantiGene de Panomics, cuyo planteamiento metodológico es totalmente diferente a los anteriores (ver material y métodos). Para determinar que ambos métodos son capaces de valorar diferentes muestras de una manera precisa, no dependiente de la concentración de ARN o del método empleado, se tomaron tres muestras control provenientes de donantes sanos y tras la extracción de ARN, se realizaron diluciones sucesivas 1:2. Este banco de diluciones se valoró por duplicado mediante los citados métodos. Dado que los valores de POMC en los controles sanos, se pueden considerar valores medios, respecto a los observados en pacientes, una dilución 1/8 representaría un valor ciertamente bajo, por lo que se considera que los dos métodos poseen una sensibilidad suficiente para este estudio y su coeficiente de correlación indica que serían igualmente óptimos para el estudio de la expresión de la POMC.

Estas variaciones en la expresión genética del sistema opioide endógeno pueden aportarnos nuevos parámetros para valorar la eficacia analgesica por via intratecal de anestésicos locales y opiáceos, y su influencia en la rehabilitación postoperatoria .

La realización de anestesia subaracnoidea atenúa pero no inhibe del todo la respuesta endocrino metabólica consecuyente con la agresión quirúrgica. La utilización de opiáceos intratecales asociados a los anestésicos locales, en la cirugía de la prótesis de cadera, consigue una mejor analgesia postoperatoria que no requiere de opiáceos sistémicos complementarios.

En la fase II (Intraquirúrgica) encontramos una disminución de los valores de POMC y ACTH, estadísticamente significativa, que difiere de otros estudios donde los valores de ACTH aumentan ^(7, 10). Este descenso acusado de la expresión del gen POMC y los niveles plasmáticos de ACTH, ocurre en el intervalo de tiempo comprendido entre la punción del catéter intravenoso (1ª muestra, fase I) y la punción de la vía venosa central por vena basílica (2ª muestra, fase II), en este intervalo ocurre :

Punción intradural con anestésico local mas metadona

Sedación

Incisión quirúrgica.

Este hallazgo contrasta con otros estudios donde, aunque en menor medida en anestesia raquídea versus anestesia general, existe aumento de la respuesta endocrino-metabólica durante el comienzo de la cirugía. ^(7- 10)

La anestesia basada en la analgesia disminuye la respuesta inmuno-metabólica al estrés quirúrgico, el bloqueo subaracnoideo con anestésicos locales mas opiáceos tiene un efecto inhibitorio de la respuesta al estrés quirúrgico, al reducir el impulso nociceptivo aferente, y por lo tanto, tiene repercusión en la recuperación postoperatoria del paciente. Además la asociación de opiáceos intratecales (en nuestro estudio metadona) permite reducir la dosis de anestésicos locales necesarios para la realización de la cirugía de la prótesis de cadera, con la consecuente disminución de sus efectos secundarios y complicaciones perioperatorias, y proporciona una buena analgesia postoperatoria.

La respuesta del organismo frente al estrés quirúrgico resulta de gran interés para el anestesiólogo, pues de esta forma se puede comprender cómo responde el organismo ante cualquier agresión de forma general y/o particular y cuáles son los mecanismos con que contamos para evitarlos o minimizarlos.

Los pacientes sometidos a cirugía mayor bajo técnicas anestésicas dirigidas a atenuar la respuesta al estrés quirúrgico, no solo obtienen una rápida recuperación tras una intervención quirúrgica sino que además se verá reducida su morbimortalidad con lo que se mejora ostensiblemente la calidad asistencial objetiva y subjetivamente⁽⁸⁴⁾.

Parece inevitable que en los próximos años se vea una evolución constante de los conocimientos, que se relacionan con la importancia de los sistemas neuroendocrino e inmunitario, en la integración y modulación de la respuesta metabólica a una lesión quirúrgica, creándose nuevas líneas de investigación en el campo de las variaciones genéticas en relación con el estrés perioperatorio.

Creemos que este estudio pudiera considerarse como punto de partida y ante los resultados obtenidos se podrían justificar nuevas experiencias, para observar la respuesta de los linfocitos periféricos al expresar el gen POMC, relacionadas con diferentes técnicas anestésicas o en diferentes tipos de cirugía. Teniendo como base los nuevos conocimientos del modelo arquetipo del procesamiento de la prohormona POMC y de sus diferentes “*roles*”^(92,93).

Una línea de investigación podría orientarse hacia el estudio del dolor postoperatorio en nuestra práctica clínica, con especial interés en los procesos de hiperalgia, alodinia y tolerancia a opioides, e intentar encontrar una relación con la modulación inhibitoria de la información nociceptiva que realizan las beta-endorfinas. Cuantificando el exon 3 de gen POMC en relación con estos procesos (hiperalgesia y tolerancia a opioides) y la expresión del exon 1 y 2 junto con factores que determinan su activación (PC1, PC2).

Estas variaciones en la expresión genética del sistema opioide endógeno pueden aportarnos nuevos parámetros para valorar la eficacia analgesica por via intratecal de anestésicos locales y opiáceos, y su influencia en la rehabilitación postoperatoria .

Conclusiones

VII. CONCLUSIONES.

- 1) El proceso anestésico quirúrgico conlleva unos niveles de estrés, que pueden observarse midiendo diferentes parámetros como son los niveles plasmáticos de ACTH y la expresión de gen POMC en linfocitos periféricos.

- 2) En la fase II, intraoperatorio, encontramos una disminución de la expresión en linfocitos periféricos del gen POMC, y también disminuyen los niveles plasmáticos de ACTH, ambos valores son estadísticamente significativos.

- 3) Durante la recuperación posquirúrgica inmediata (fase III) los niveles plasmáticos de ACTH son muy bajos (en algunos casos indetectables), mientras que la expresión de POMC aumenta.

- 4) A las 48h de la intervención quirúrgica (fase IV) los valores de POMC, si prescindimos de los valores extremos “*outliers*”, son superiores a los encontrados preoperatoriamente (fase I), luego la expresión de este gen durante el periodo postoperatorio presenta un aumento progresivo. En esta fase los valores de ACTH también se incrementan.

Bibliografía

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Cannon WM. Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. Segunda edición. Boston: Charles T. Bradford Co, 1953.
2. Selye H. The stress of life. New York: Mc Graw-Hill Book Co, 1984
3. Moore FD. Bodily changes in surgical convalescence I. The normal sequelae: observations and interpretations. *Ann Surgery* 1953; 137: 289-293.
4. Egdahl RH. Pituitary-Adrenal response following trauma to the isolated leg. *Surgery* 1959; 46: 9-14.
5. Wilmore DW, Long JM, Mason AD, Pruitt BA. Stress in surgical patients as a neurophysiologic reflex response. *Surg Gynecol Obstet* 1976; 142: 257-262.
6. Bromage PR, Shibata HR, Willoughby HW. Influence of prolonged epidural blockade on blood sugar and cortisol responses to operations upon the upper part of the abdomen and the thorax. *Surg Gynecol Obstet* 1971; 132:1051-1054.
7. Engquist A, Brandt MR, Fernandes A, Kehlet H. The blocking effect of epidural analgesia on the adrenocortical and hyperglycaemic responses to surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 1977; 21: 330-335.
8. Engquist A, Fog-Moller F, Christiansen C, Thode J. Influence of epidural analgesia on the catecholamine and cyclic AMP responses to surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 1980; 24: 17-21.
9. Kehlet H. The stress response to anaesthesia and surgery: Release mechanisms and modifying factors. *Clinics in Anaesthesiology* 1984; 2: 315-339.
10. Hall GM, Desborough JP. Endocrine and metabolic responses to surgery and injury. Effects of anesthesia. En: Prys Roberts C, Brown BR, editores. *International Practice of Anaesthesia*. Oxford: Butterworth-Heinemann. 1996; 79: 1-11.

11. Reisine T. neurohumoral aspects of ACTH release.
Hospital Practice 1988; 23: 77-96.

12. Hall GM, Young C, Holdcroft A, Alaghband-Zadeh J. Substrate mobilisation during surgery. *Anaesthesia* 1978; 33:924-927.

13. Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and etherogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest.* 2000; 106: 253-262.

14. Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, et al. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest.* 2000 106: 271-279.

15. Krude H. Güters A. Implications of Proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: The POMC Deficiency Syndrome. *Trends in Endocrinol. Metab.* 2000, 11; 15-22.

16. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutation in humans. *Nat Genet.* 1998, 19 ; 155-157.

17. Rosmond R, Ukkola O, Bouchard C, Bjorntorp P. Polymorphisms in exon 3 of the proopiomelanocortin gene in relation to serum Leptin, salivary cortisol, and obesity in Swedis men. *Metabolism.* 2002 May : 51(5) : 642-644.

18. Rees DA., Hepburn PJ, McNicol AM, et al. Loss of ACTH expression in cultured human corticotroph macroadenoma cells is consistent with loss of the POMC gene signal sequence. *Mol. And Cell Endocrinology.* 2002, 189; 51-57.

19. "Effect of morphine on proopiomelanocortin gene expression and peptide levels in the hypothalamus". *Mol. Brain Res.* 1996 Sep. 5;41 (1-2) : 140-147.

20. "Stress-induced stimulation of pituitary POMC gene expression is associated with activation of transcription factor AP-1 in hypothalamus and pituitary".
Brain Res Bull 1998 , 45(1): 75-82.
21. George JM, Reier GE, Lanese RR, Rower JM. Morphine anaesthesia blocks cortisol and growth hormone response to surgical stress in humans.
Journal Clin. Endocrinol Metab 1974; 38: 736-742.
22. Stanley TH, Berman L, Green O, Robertson DH, Roizen L.
Fentanyl-oxygen anesthesia for coronary artery surgery: Plasma catecholamine and cortisol responses.
Anesthesiology 1979; 51: S139-S142.
23. Simonnet G. Rivat C.
"Opioid-induced hyperalgesia: Abnormal or normal pain ?"
NeuroRepor 2003 Vol 14, pag 1-7.
24. Guignard B. Bossard AE. Coste C. et al
" Acute opioid tolerance: Intraoperative Remifentanil increase postoperative pain and morphine requirement "
Anesthesiol. 2000 ; 93: 409-417.
25. Davis AM. Inturrisi CE. Dp. Pharmacology. Cornell University Medical College. New York.
"d-Methadone blocks morphine tolerance and N-methyl-D-Aspartate-induced hyperalgesia"
J. Pharmacol. Exp. Ther 1999 May ; 289(2)1048-53
26. Neira F, Ortega JL.
"Etiopatogenia y efectos funcionales del dolor postoperatorio."
Torres LM. Tratamiento del dolor postoperatorio. Ediciones Ergon SA, 2003. p. 3-30.
27. Sorkin LS.
"Farmacología y fisiología básica del proceso del dolor agudo."
En: Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL. Clínicas de Anestesiología de Norteamérica. México: McGraw-Hill Interamericana 1997; 2: 245-59.

28. Wei F, Dubner R, Ren K.
“Nucleus reticularis gigantocellularis and nucleus raphe magnus in the brain stem exert opposite effects on behavioral hyperalgesia and spinal Fos protein expression after peripheral inflammation.” *Pain* 1999; 80: 127-41.
29. Sukiennik AW, Kream RM.
“N-methyl-D-aspartate receptors and pain.”
Current Op Anaesth 1995; 8: 445-9.
30. Baron R. Pain memories: short and long-term alterations in CNS function after tissue inflammation and pain.
Dolor 1998; 13 (Supl. III): 9-17.
31. Linden DR, Seybold VS.
“Spinal neurokinin3 receptors mediate thermal but not mechanical hyperalgesia via nitric oxide”. *Pain* 1999; 80: 309-17.
32. Perez J, Mercadal J, Plaza A, De Santos P .
“Use of Methadone as an Adjuvant to Spinal Bupivacaine for Vaginal Hysterectomy. Implications of the Quality of Anesthesia and Analgesia”.
Reg Anesth Pain Med 2005; 30(3):A12
33. L. A. Moreno.
“ Asociación de farmacos via espinal”
Anestesia Regional. Cap. 11 pag 155
34. Cuestas P. Souto JM. Elguezabal G. Montero A.
“Eficacia de la metadona intratecal combinada con bupivacaína en la analgesia postoperatoria”
CONGRESO sobre Mecanismos y Tratamiento del dolor (FORO para el estudio del dolor). Barcelona Marzo del 2001.
35. Martí C. Elguezabal G. Cuestas P. Souto JM. Montero A.
"Tratamiento intratecal con Bupivacaína + Metadona v.s. Bupivacaína + Fentanilo v.s. Bupivacaína “.
V CONGRESO de la SOCIEDAD ESPAÑOLA DEL DOLOR.
Salamanca Octubre 2002.

36. Cuestas P, López V, Rueda F, Hueso M, Montero A.
"Cuantificación de la expresión del gen proopiomelanocortina (POMC) en linfocitos periféricos de pacientes sometidos a cirugía bajo anestesia intradural."
I CONGRESO de la Sociedad Catalana de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor. Barcelona 18 de Octubre del 2003.
37. Cuestas P, López V, Martín C, Elguezabal G, Rueda F, Montero A.
" Cuantificación de la expresión de POMC en linfocitos periféricos de pacientes sometidos a cirugía bajo anestesia intradural".
XXVII Congreso de la Sociedad Española de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor. Mallorca Junio 2005.
38. Olivard T, Laird JMA.
"Efectos diferenciales del bloqueo de los receptores. de nmda en los reflejos nociceptivos somáticos y viscerales."
Revista de la Sociedad Española del Dolor 2000.7:291-300.
39. Zhou S, Bonasera L, Carlton SM.
"Peripheral administration of nmda, ampa or ka results in pain behaviors in rats".
Neuro Repor 1996.1996:895-900.
40. Lawand NB, Willis WD, Westluna KN.
"Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociptive transmission in rats".
European Journal of Pharmacology 1997.324:169-177.
41. Pedersen JL, Galle TS, Kehlet H.
"Peripheral analgesic effects of ketamine in acute inflammatory pain".
Anesthesiology 1998.89: 58-66.
42. Hewitt DJ.
"The use of nmda receptor antagonists in the treatment of chronic pain".
The Clinical Journal of Pain 2000.16:573-579.
43. Sukiennik AW, Krean RM.
"N-methyl-d-aspartate receptors and pain".
Current Opinion in Anesthesiology 1995.8:445-449.
44. - Chomczynski P.
" A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples".
Biotechniques, 15(3):532-4, 536-7, 1993.

45. - Lande-Diner L, Zhang J, Ben-Porath I, Amariglio N, Keshet I, Hecht M, Azuara V, Fisher G. A, Rechavi G, Cedar H.
 “Role of DNA Methylation in Stable Gene Repression”.
 The Journal of Biological Chemistry, 282(16): 12194–12200, 2007.
46. - Hendriksen WT, Silva N, Bootsma HJ, Blue CE, Paterson GK, Kerr AR, de Jong A, Kuipers OP, Hermans PW, Mitchell TJ.
 “Regulation of gene expression in *Streptococcus pneumoniae* by response regulator 09 is strain dependent”.
 J Bacteriol. 2007 ;189(4):1382-9.
47. - Hung RJ, Chien HS, Lin RZ, Lin CT, Vatsyayan J, Peng HL, Chang HY.
 “Comparative analysis of two UDP-glucose dehydrogenases in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1”.
 J Biol Chem. 2007;282(24):17738-48.
48. - Standal T, Abildgaard N, Fagerli UM, Stordal B, Hjertner O, Borset M, Sundan A.
 “HGF inhibits BMP-induced osteoblastogenesis: possible implications for the bone disease of multiple myeloma”.
 Blood. 2007;109(7):3024-30.
49. - Sui Z, Sniderhan LF, Schifitto G, Phipps RP, Gelbard HA, Dewhurst S, Maggirwar “Functional synergy between CD40 ligand and HIV-1 Tat contributes to inflammation: implications in HIV type 1 dementia”.
 J Immunol. 2007 Mar 1;178(5):3226-36.
50. - Yu Y, Dong W, Altimus C, Tang X, Griffith J, Morello M, Dudek L, Arnold J, Heinz-Bernd S.
 “A genetic network for the clock of *Neurospora crassa*”.
 Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(8): 2809–2814.
51. Moore, S. (1981)
 “Pancreatic DNase In: The Enzymes”.
 Volume 14A, P.D. Boyer, Ed., Academic Press, New York, 281
52. Kotewicz, M.L., D'Alessio, J.M., Driftmier, K.M., Blodgett, K.P., and Gerard, G.F. “Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*”.
Gene.(1985) 35: 249.
53. Gerard, G.F., D'Alessio, J.M., Kotewicz, M.L., and Noon, M.C.
 “Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase”.
DNA. (1986) 5: 271.

54. Houts, G.E., Miyagi, M., Ellis, C., Beard, A., and Beard, J.W.
“Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus”.
J. Virol. (1979) 29: 517.
55. Kotewicz, M.L., Sampson, C.M., D'Alessio, J.M., and Gerard, G.F.
“Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity”.
Nuc. Acids Res. (1988) 16: 265.
56. - Oste C.
“Polymerase chain reaction”.
Biotechniques. 1988 Feb;6(2):162-7.
57. Fox RI, Dotan I, Compton T, Fei HM, Hamer M, Saito I.
“Use of DNA amplification methods for clinical diagnosis in autoimmune diseases”.
J Clin Lab Anal. 1989; 3(6):378-87.
58. - Nishikawa BK, Fowlkes DM, Kay BK.
“Convenient uses of polymerase chain reaction in analyzing recombinant cDNA clones. *Biotechniques.* 1989 Jul-Aug;7(7):730-5.
59. Kulozik AE, Lyons J, Kohne E, Bartram CR, Kleihauer E.
“Rapid and non-radioactive prenatal diagnosis of beta thalassaemia and sickle cell disease: application of the polymerase chain reaction (PCR)”.
Br J Haematol. 1988; 70(4):455-8.
60. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA.
DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1988; 85(24):9436-40.
61. Kumar R, Barbacid M.
“Oncogene detection at the single cell level”.
Oncogene. 1988; 3(6):647-51.
62. Hoffman LM, Hundt H.
“Use of a gas chromatograph oven for DNA amplification by the polymerase chain reaction”.
Biotechniques. 1988; 6(10):932, 934-6.

63. - Beck BN, Ho SN.
 “Increased specificity of PCR-amplified products by size-fractionation of restriction enzyme-digested template genomic DNA”.
Nucleic Acids Res. 1988; 16(18):9051.
64. - Kim HS, Smithies O.
 “Recombinant fragment assay for gene targetting based on the polymerase chain reaction”.
Nucleic Acids Res. 1988; 16(18):8887-903.
65. Laure F, Courgnaud V, Rouzioux C, Blanche S, Veber F, Burgard M, Jacomet C, Griscelli C, Brechot C.
 “Detection of HIV1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction”.
Lancet. 1988; 2(8610):538-41.
66. Beyser K, Reiser A, Gross C, Möller C, Tabiti K and Rüschoff J.
 “Real-time Quantification of HER2/neu Gene Amplification by LightCycler Polymerase Chain Reaction (PCR) – a New Research Tool”.
Biochemica (2001) **2**: 15 – 18.
67. Soong R and Tabiti K
 “Relative Quantification of Cytokeratin 20 on the LightCycler Instrument”.
Biochemica (2001) **2**: 19 – 22.
68. Sagner G and Goldstein C.
 “Principles, Workflows and Advantages of the New LightCycler Relative Quantification Software”.
Biochemica (2001) **3**: 15 – 17.
69. Soong R, Beyser K, Basten O, Kalbe A, Rueschoff J, Tabiti K.
 “Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Detection of Cytokeratin 20 in Noncolorectal Lymph Nodes”.
Clinical Cancer Research, (2001) **7**: 3423 – 3429.
70. Afonina, I., Zivarts, M., Kutuyavin, I., *et al.* 1997.
 ”Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder”.
Nucleic Acids Res. 25:2657–2660.
71. - Förster, V. T. 1948.
 Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.
Annals of Physics (Leipzig) 2:55–75.

72. Kutuyavin, I.V., Lukhtanov, E.A., Gamper, H.B., and Meyer, R.B. 1997. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res.* 25:3718–3723.
73. Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. “Avoiding false positives with PCR”. *Nature* 339:237–238.
74. - Lakowicz, J.R. 1983. Energy Transfer. In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press 303–339.
75. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408.
76. - Longo, M.C., Berninger, M.S., and Hartley, J.L. 1990. “Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions”. *Gene* 93:125–128.
77. Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987. “Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction”. *Methods Enzymol.* 155:335–350.
78. - Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.* 1985. “Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia”. *Science* 230:1350–1354.
79. Todd MD, Lin X, Stankowski LF Jr, Desai M, Wolfgang GH. “Toxicity Screening of a Combinatorial Library: Correlation of Cytotoxicity and Gene Induction to Compound Structure”. *J Biomol Screen.* 1999; 4(5):259-268.
80. - Warrior U, Fan Y, David CA, Wilkins JA, McKeegan EM, Kofron JL, Burns DJ. “Application of QuantiGene nucleic acid quantification technology for high throughput screening”. *J Biomol Screen.* 2000; 5(5):343-52.

81. Vansell NR, Klaassen CD.
“Increase in rat liver UDP-glucuronosyltransferase mRNA by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormone glucuronidation”.
Drug Metab Dispos. 2002; 30(3):240-6.
82. - Wu SJ, Spink DC, Spink BC, Kaminsky LS.
“Quantitation of CYP1A1 and 1B1 mRNA in polycyclic aromatic hydrocarbon-treated human T-47D and HepG2 cells by a modified bDNA assay using fluorescence detection”.
Anal Biochem. 2003 15; 312 (2):162-6.
83. Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermler B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY, Ma Y, Maqsodi B, Papallo A, Peters EH, Poulter K, Ruppel PL, Samaha RR, Shi L, Yang W, Zhang L, Goodsaid FM. “Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms”. Nat Biotechnol. 2006; 24(9):1115-22.
84. Liu SS, Carpenter RL, Neal JM.
“Epidural anesthesia and analgesia”.
Anesthesiology 1995; 82: 1474-1506.
85. Weissman C.
“The metabolic response to stress: An overview and update.”
Anesthesiology 1990; 73: 380-327.
86. Clarke RSJ.
“The hyperglycaemic response to different types of surgery and anaesthesia.
British Journal of Anaesthesia 1970;42: 45-48.
87. Clarke RSJ, Johnson H, Sheridan B.
“The influence of anaesthesia and surgery on plasma cortisol, insulin and free fatty acids”.
British Journal of Anaesthesia 1970; 42: 295-299.
88. Traynor C, Hall GM.
“Endocrine and metabolic changes during surgery: Anesthetic implications.
British Journal of Anaesthesia 1981; 53: 153-160.
89. Chernow B, Alexander HR, Smallridge RC, Thompson WR, Cook D, Beardsley D, y cols.
“Hormonal response to graded surgical stress”.
Arch Intern Med 1987; 147: 1273-1278.

90. Kehlet H.

“The stress response to surgery. Release mechanisms and the role of pain to relief.
Acta Chir Scand 1988; Suppl 550: 22-28.

91. Lopez Andrada A , Almazan A, Martin Ruiz JL. Samaniego F,
Lopez Andrada MA, Del Campo A.

“ Respuesta inmune en el paciente quirurgico, influencia de la anestesia y la
trasfusión sanguínea.”

Rev. Esp. Anestesiología y Reanimación 2000 ; 47: 67-80.

92. Raffin-Sanson ML, de Keyzer Y, Bertagna X.

“Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from
physiology to pathological conditions”.

Eur J Endocrinol. 2003 Aug;149(2):79-90.

93. Bicknell AB.

“The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin”.

J Neuroendocrinol. 2008 Jun;20(6):692-9.

IX. ANEXO: CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Consentimiento informado, según la declaración de Helsinki y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de Bellvitge:

Estudio: CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE PROOPIOMELANOCORTINA EN LINFOCITOS PERIFÉRICOS DE PACIENTES SOMETIDOS A CIRUGÍA.

En nuestro Servicio se está realizando un estudio que tiene como objetivo valorar las variaciones del Sistema opioide endógeno en pacientes programados para cirugía, y consiste en recoger información para conocer mejor este sistema.

Los datos personales y clínicos son parte de los que figuran en su historia clínica del Servicio de Anestesiología y ninguna persona ajena tiene acceso. Cuando los datos se traten estadísticamente o se utilicen para estudios epidemiológicos o médicos se hará siempre de manera confidencial.

El material medico obtenido se utilizara para estudios genéticos. Estos datos se trataran de forma anónima y confidencial y siempre teniendo en cuenta la Declaración Universal sobre el Genoma Humano. Como estos datos no se podrán interpretar hasta dentro de un tiempo, no se informará individualmente de los resultados.

Si acepta que sus datos estén incluidos en este estudio, Ud. no obtendrá ningún beneficio ni perjuicio, pero contribuirá a la mejoría de la atención medica.

Este estudio está aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica. Proyecto de investigación nº **176/05**

Ud. es totalmente libre de aportarnos sus datos, y si rehusara no tendrá ningún perjuicio en su asistencia. Pregúntenos cualquier duda o información complementaria.

Si su decisión es afirmativa firme esta hoja:

He leído la información y comprendiéndola acepto que mis datos estén incluidos en este estudio en las condiciones expresadas.

Firma del paciente

Firma del medico

Nombre y apellidos

Nombre y apellidos