

Análisis fisiológico de la acción fibrinolítica de bromelinas sobre una trombosis experimental

RAFAEL AMARIS CASTELAR¹, ARNULFO CASTRO CORONA², MIGUEL A. BARRIENTOS³, CRUZ REYES VASQUEZ⁴ y HECTOR BRUST CARDONA⁵.

Se evaluó la acción fibrinolítica de las bromelinas (BRO) sobre una trombosis experimental inducida por destrucción del endotelio vascular en una porción de la arteria femoral de perros ($n = 10$). Se hicieron registros de: resistencia galvánica de la piel (RGP), temperatura subcutánea proximal (TP) y distal (TD) y flujo sanguíneo distal al sitio de lesión, frecuencia cardíaca y de ventilación y presión arterial (PA). Solo a 5 de los sujetos se les administró una dosis BRO (10mg/kg, vía I.V.) 48 horas después de inducir la trombosis.

Al final, se realizó el análisis histológico del ramo arterial lesionado, el cual comprendió: extensión y penetración de la inflamación, infiltración hemorrágica y grado de trombosis. El análisis computarizado de los registros poligráficos mostró gran variabilidad entre los sujetos desde los períodos controlados. Sin embargo, el análisis individual mostró una acción del tratamiento, especialmente en las variables RGP, flujo sanguíneo, TP, TD, y PA en la mayoría de los animales. En todos los sujetos se observó necrosis del endotelio, ruptura focal de la lámina elástica interna y diverso grado de trombosis. Los resultados apoyan una acción fibrinolítica de las BRO sugiriendo otros estudios con dosis mayores o repetidas que justifiquen su utilización en el tratamiento de enfermedades tromboembólicas.

Palabras claves: Bromelinas, trombosis, experimental, fibrinólisis, análisis de variables fisiológicas, trombolisis.

Recibido 11 de mayo, 1985. Aceptado 24 de junio, 1985.

1. Q.F., M. Sc. Profesor del Departamento de Ciencias Básicas Médicas. División de Ciencias de la Salud. Universidad del Norte. Barranquilla, Colombia.
2. M.D. Instructor. Facultad de Medicina. UNAM. México. D.F. México.
3. Actuario. Unidad de Computación. Facultad de Medicina UNAM. México D.F. México.
4. M.D., M. Sc. Profesor titular. Facultad de Medicina. UNAM. México, D.F. México.
5. M.D., M.Sc. Profesor titular. Facultad de Medicina. UNAM. México, D.F., México.

© Universidad del Norte.

Introducción

Las enfermedades tromboembólicas arteriales y venosas constituyen la causa más frecuente de mortalidad y morbilidad del ser humano adulto, especialmente en zonas urbanas y desarrolladas, incluyendo a América Latina (1, 2). Por ello, es importante el desarrollo de procesos terapéuticos que permitan evitar o corregir la trombosis. Varios autores (3-6) han descrito la utilidad terapéutica de enzimas proteolíticas en diferentes estados clínicos (inflamación, tromboflebitis, trombosis coronarias, etc.). Entre estas proteasas están las bromelinas.

Las bromelinas son sustancias que se obtienen principalmente del tallo de plantas de la familia *Bromeliaceae*. Las que han presentado mayor actividad proteolítica son las obtenidas del tallo y fruto de la *Ananas comosus* (comúnmente conocida como piña) (7). Además, poseen mínima toxicidad (8). Diferentes preparados de bromelinas (abreviaremos como BRO) se han utilizado experimental y terapéuticamente, principalmente como antiinflamatorio, administrado tanto por vía oral como por varias vías parenterales (9-12). Se ha descrito (13, 14) en las BRO la capacidad de inhibir la agregación de plaquetas y se sugiere que este efecto está en relación con la vía de síntesis de prostaglandinas en las plaquetas.

En observaciones experimentales, se encontró un aumento de la concentración sérica de plasmina y de antitrombinas, un aumento del tiempo de protrombina después de la administración oral de BRO (15) y además, un aumento en la actividad fibrinolítica del suero (8, 16, 17), posiblemente por activación del sistema plasminógeno-plasmina (8, 18, 19). Con el fin de ampliar el conocimiento de esta sustancia en relación con procesos trombolíticos nos propusimos, en este trabajo, valorar mediante el registro poligráfico de variables fisiológicas la posible actividad fibrinolítica o anti-trombótica de las BRO en un modelo "in vivo" de trombosis experimental en perros.

Material y Método

1. Maniobras quirúrgicas.

Se utilizaron 10 perros ($n = 10$) machos o hembras entre 10 y 17 kg de peso corporal; se dividieron en dos grupos: cinco controles y cinco tratados. En todos se indujo la trombosis mediante el siguiente procedimiento: los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg/kg de peso, vía I.V). Durante el acto quirúrgico en condiciones de asepsia y utilizando material e instrumental estéril, los animales ventilaron hacia el aire ambiente a través de una cánula endotraqueal; en la vena radial tuvieron una venoclisis de solución salina al 0.9%, la cual contenía la dosis de sostenimiento del anestésico, calculada a 5 mg/kg/hora. En una extremidad posterior se disecó la arteria femoral en un tramo de 3 a 4 cms. se ligaron las colaterales de ese tramo a excepción de la rama muscular (20). Este ramo arterial se aisló entre dos pinzas vasculares de Satinsky, se canuló a

través de la arteria colateral y se vació de sangre. Después de lavarlo con solución salina se llenó con una solución 0.1 N de ácido sulfúrico. La solución ácida se retiró al término de cinco minutos. El tramo muscular se lavó con agua destilada estéril haciéndola fluir a través de una aguja introducida por el extremo opuesto de la zona arterial lesionada. Después se retiraron cánula y aguja, se ligó la arteria colateral. Se retiraron las pinzas y se hizo hemostasia por compresión cuando fue necesario. Se cerraron los planos y se suturó la piel utilizando seda.

2. Diseño experimental

Una hora previa a la inducción de la trombosis se iniciaba el registro poligráfico de las siguientes variables: resistencia galvánica de la piel (RGP), flujo sanguíneo de la arteria femoral, temperatura subcutánea proximal y distal al sitio de trombosis, frecuencia cardíaca y de ventilación. Se realizaron seis períodos de registro de tres minutos iniciados cada 10 minutos (fase 1 de registros). A esta fase 1 se le consideró registro control del sujeto correspondiente. Luego, se procedía a inducir la trombosis. Cuarenta y ocho horas después, nuevamente bajo anestesia general, los animales fueron sometidos inicialmente a la fase 2 de registro de las variables mencionadas, además de la presión arterial, durante una hora y con las mismas características de la fase 1. Inmediatamente después se aplicó la solución salina isotónica (grupo control, $n = 5$) o la solución de BRO. Las BRO (Laboratorios RORER de México) diluidas en solución salina isotónica (10mg/ml) se administraron en dosis de 10 mg/kg a través de la venoclisis, en un tiempo que varió entre cuatro y 10 minutos. Dentro de los 10 minutos siguientes se reinició el registro de todas las variables por un tiempo de 240 minutos. (fase 3 de registros, tres minutos de registros cada 10 minutos). En el cuadro 1 se resumen las fases de registros y su duración y características. Finalizada la obtención de registros, el tramo de arteria femoral lesionada se aisló y se cortó por sus extremos e inmediatamente se abrió longitudinalmente para la verificación de trombosis, se colocó en solución de formaldehído al 10% para su posterior análisis histológico.

3. Registros poligráficos

Las variables fisiológicas se registraron en un

polígrafo (GRASS, Mod. 7) y en un fisiógrafo (Physiograph six, Narco Biosystems). Además, algunas variables se grabaron en cinta magnética (grabadora Ampex PR-500). Las variables registradas fueron:

3.1 Resistencia galvánica de la piel (RGP): los electrodos, separados 3 cm entre sí se colocaron en el extremo distal de la cara interna del muslo en que se indujo la trombosis (preamplificador GRASS, Mod. 7 P1A).

3.2 Flujo sanguíneo arterial femoral: se midió mediante un fluxómetro (Gould Statham, Mod. 2202) que utiliza el método de impedancia electromagnética. La sonda electromagnética se colocó alrededor de la arteria femoral, distalmente, 2 cm al sitio de trombosis. La señal eléctrica procedente del fluxómetro se registró en papel a través del polígrafo y también se grabó en cinta magnética.

3.3 Temperatura subcutánea proximal (TP) y distal (TD): se utilizaron dos termopares de disco (YSI series 700 No. 708) y acopladores de temperatura (tipo 7174) del fisiógrafo. Los termopares fueron introducidos por la incisión realizada para diseccionar la arteria femoral, se colocaron: uno, proximal y otro, distal en relación al sitio de trombosis.

3.4 Frecuencia cardíaca: se calculó del electrocardiograma (EKG) registrado poligráficamente y grabado en cinta magnética. Los electrodos de aguja se colocaron a nivel torácico.

3.5 Frecuencia de ventilación: se registró poligráficamente (preamplificador Mod. 7P5), la señal procedía de un transductor de temperatura (Termopar de respiración, Narco Biosystems) colocado a la salida de la cánula endotraqueal.

3.6 Presión arterial: su medición, por el método directo, se realizó únicamente durante las fases 2 y 3, en la arteria femoral contralateral a la trombosada y utilizando un transductor de presión (Narco Biosystems, Mod. P1000B) conectado al fisiógrafo; a su vez, la señal eléctrica correspondiente también se grabó.

4. Análisis de los registros

Las tres fases de registro de cada sujeto sumaron un total de 36 períodos de tres minutos ca-

da uno: seis antes de la inducción del trombo; seis posteriores a la inducción de la trombosis y 24 posteriores a la administración de solución salina o de bromelinas. En los registros en papel de RGP, de TP y de TD se obtuvieron valores promedios (calculados a intervalos de 30 segundos) representativos de cada período. Del registro de ventilación se obtuvo la frecuencia por minuto representativa de cada período. El análisis de los registros grabados de flujo sanguíneo, EKG y presión arterial (PA) se realizó en una computadora DEC PDP 11/40 utilizando un programa específico elaborado en lenguaje Fortran IV. De los registros de PA y de flujo sanguíneo se promediaron los valores obtenidos cada 8 miliseg. y al final de cada período se mostraban en relación al valor de calibración dado previamente en mm de Hg o ml/min. respectivamente. El promedio total de cada variable correspondía al promedio/min representativo del período. Del registro de EKG, el programa contaba los "picos" (complejos QRS) que sobrepasaban de un nivel de voltaje dado previamente y mostraba al final de los tres minutos la frecuencia/min de ese período. Los resultados de las variables eran mostrados en papel y además, almacenados en disco magnético para su posterior análisis estadístico.

5. Análisis estadísticos de los resultados

En la evaluación estadística se utilizó el Sistema Interactivo de Análisis Bioestadístico (SIAB) (21) introducido en la computadora. Las pruebas utilizadas fueron: a) "t" correlacionada; b) análisis de regresión simple; y c) análisis de regresión múltiple.

6. Análisis histológico

Los tramos de todas las arterias lesionadas se fijaron en formol al 10%. Posteriormente, se incluyeron en parafina y se hicieron cortes transversales de 7 μ m; se realizaron tres tipos de tinciones: a) Hematoxilina - eosina; b) Verhoeff y c) Masson.

Se valoró la destrucción del endotelio (intimectomía), la inflamación e infiltración hemorrágica en la pared vascular y la presencia y la extensión de la trombosis. A estos resultados, cuantificados porcentualmente, se les aplicó la transformación geométrica arcoseno de la raíz cuadrada y se les sometió la prueba estadística U de Mann Withney (21, 22).

Resultados

1. Registro de variables fisiológicas

El cuadro 2 resume los cambios significativos que mostraron todas las variables en todos los sujetos en las tres fases del experimento.

CUADRO No. 1

REGISTROS DE 3 MIN. CADA 10 Min.

Registros	Duración	Observaciones
Fase 1	60 min.	Antes de inducir trombosis
Fase 2	60 min.	Después de inducir trombosis.
Fase 3	240 min.	Después de tratamiento (Solución salina o BRO).

CUADRO 2. Variables registradas

Sujeto	RGP		Flujo		TP		TD		FC		FV		PA	
1 C	*	*	↓	—	*	↓	*	↓	—	↓	—	↓		↓
2 C	↓	↓	—	*	↓	—	↓	—	↓	*	↓	—		—
3 C	*	—	+	+	*	—	*	*	+	+	*	↓		+
4 C	↓	—	↓	—	↓	—	↓	—	↓	—	↓	—		↓
5 C	*	*	*	—	*	↓	—	↓	↓	↓	—	—		↓

1 B	*	*	—	—	*	*	*	*	*	*	—	—		↓
2 B	*	↓	↓	—	*	—	*	↓	*	*	*	—		*
3 B	↓	*	↓	—	*	*	—	—	—	—	↓	—		*
4 B	↓	*	*	—	*	*	—	*	↓	↓	—	—		—
5 B	↓	*	—	↓	—	*	↓	—	—	—	↓	↓		—

1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 2

* = Incremento
 ↓ = Decremento
 — = No cambio significativo

1 = Cambio de la fase 2 con respecto a la fase 1.
 2 = Cambio de la fase 3 con respecto a la fase 2.
 + = Por dificultades técnicas se desconocen éstos datos.

El análisis estadístico empleado fue la t correlacionada. En este cuadro, la presencia de un asterisco, una flecha dirigida hacia abajo o un guión representan un incremento, un decremento o la no existencia de un cambio estadísticamente significativo ($p < 0.05$) respectivamente. En el cuadro, cada una de las variables contiene dos columnas: la primera, describe el cambio sucedido en la fase 2 con respecto a la fase 1; la segunda muestra el cambio en la fase 3 con relación a la fase 2.

La RGP tuvo diferentes valores en controles y tratados desde la fase previa a la inducción del trombo considerando a todos los sujetos. Así, los cambios de RGP observados en la segunda fase con respecto a la primera fase fueron de dirección opuesta en diferentes animales, independientemente del grupo al que pertenecían. En la primera columna de la variable RGP (cuadro 2) se muestra el efecto de la inducción del trombo. En los sujetos controles, la respuesta de la variable no fue constante. Tres sujetos mostraron un incremento, mientras que los restantes un decremento. La dirección de esta respuesta se mantuvo durante la tercera fase, a excepción de dos sujetos en los que no hubo ninguna diferencia (segunda columna). Por el contrario, la respuesta en los sujetos experimentales (tratados) en la fase 2 fue principalmente de una disminución, observada en tres de los cinco sujetos. En estos cinco animales la administración de BRO invirtió la dirección de la respuesta en cuatro de los mismos.

El flujo sanguíneo mostró variabilidad en todos los sujetos. Por ejemplo: considerando tanto animales controles como tratados se observa que el 78% de ellos presentaron disminución del flujo sanguíneo posterior a la inducción de trombosis (cuadro 2). Aunque solo el 47% de esta disminución alcanza valores con significación estadística ($p < 0.05$). En dos casos se observó un incremento del flujo en la fase 2 (sujetos 5c y 4b). Posterior a la inyección de solución salina (controles), persistieron las mismas condiciones y solo un sujeto que no había mostrado cambios por la trombosis ahora presenta un incremento del flujo (sujeto 2c). La situación es similar en los sujetos tratados con BRO, no se observa cambio significativo, a excepción de un sujeto (5b) que, aunque no mostró cambio significativo posttrombótico del flujo, ahora si presenta una disminución del mismo.

Otra de las variables de carácter local, que podría mostrar cambios más relacionados por efecto tanto de la trombosis como del tratamiento, lo constituyen la TP y la TD al sitio de trombosis. La TP y la TD fueron diferentes en todos los animales. La TD siempre mostró valores ligeramente menores que la TP (figs. 1-4). En el

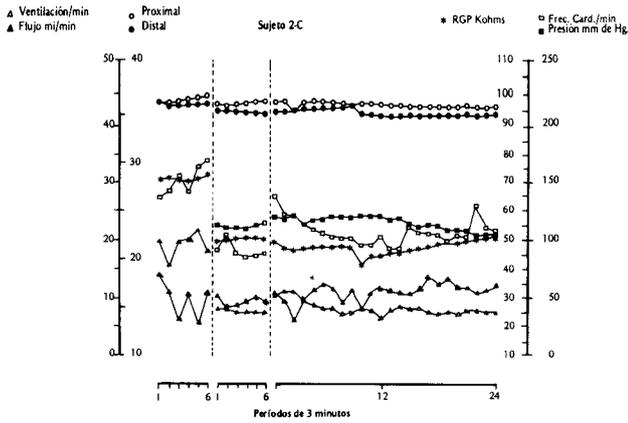


Fig. 1. Sujeto 2-C

caso de los sujetos controles, tres de ellos mostraron un incremento de TP y ninguno mostró decremento de TD, sino más frecuentemente también existió un incremento de la TD en los mismos sujetos. Los otros dos sujetos que mostraron una disminución de TP, también mostraron una disminución de TD (cuadro 2). En otras palabras, la relación entre ambas variables siempre fue directa. Esta situación se observó en los animales experimentales antes del tratamiento: cuatro de ellos mostraron un incremento de TP y tres de los mismos un incremento de TD. En

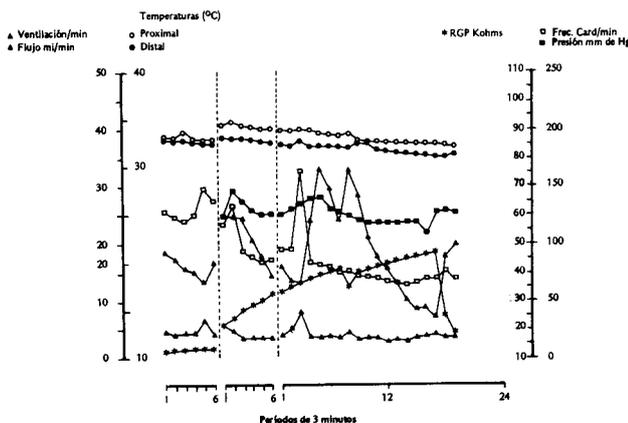


Fig. 2. Sujeto 5-c

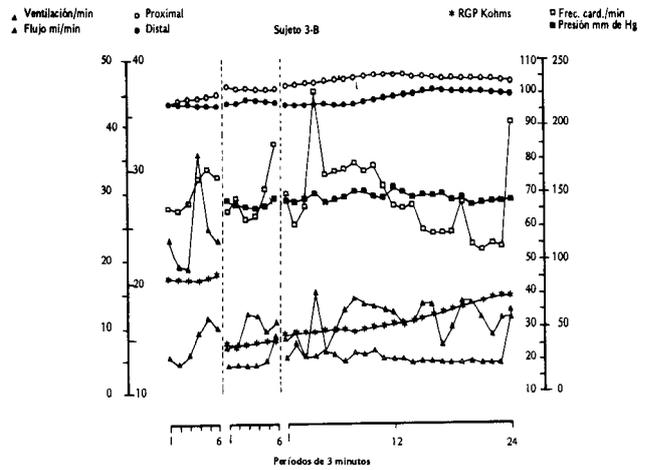


Fig. 3. Sujeto 3-B

la tercera fase del experimento, después de la administración de solución salina (grupo control) existe inversión de la respuesta de aumento en la TP y en la TD en dos de los sujetos y ningún cambio en los otros; sin embargo, mantuvieron ellos la relación directa, obteniendo un coeficiente de correlación lineal de 0.987. Después del tratamiento con BRO, la TP aumentó aun más en cuatro sujetos, mientras que la TD sólo aumentó en uno, disminuyó en otro y no se modificó significativamente en los restantes (cuadro 2). El análisis de regresión para TP y TD en la fase 3 de este grupo mostró un buen coeficiente de correlación lineal, calculado en 0.958.

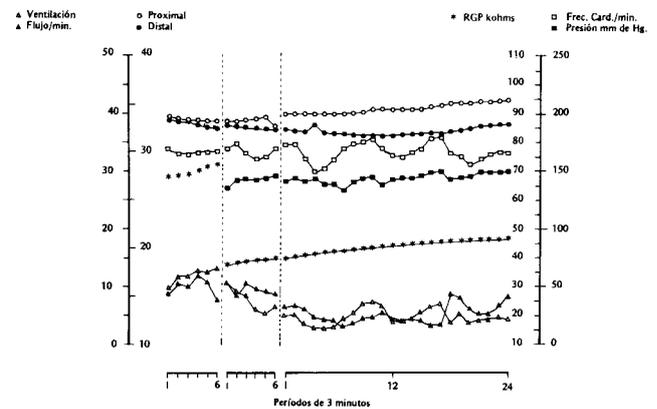


Fig. 4. Sujeto 5-B

La FC fue la variable que presentó mayor diversificación de sus valores, tanto al comparar las diferentes fases, así como entre los períodos de cada una de las fases, particularmente durante la tercera. En tres de los sujetos controles se observó una disminución de la FC en la fase poste-

rior a la inducción del trombo, mientras que tres de los sujetos experimentales mostraron un incremento en la misma fase. El resto de sujeto no mostró cambios significativos. En la tercera fase, alguno de los cambios persisten en la misma dirección, pero sin ninguna correlación definida con los encontrados en la fase 2.

Después de la inducción del trombo, la FV se modificó en 3 y 4 de los sujetos controles y experimentales respectivamente. Aunque esta respuesta fue también variable, la principal tendencia es hacia la disminución en ambos grupos (primera columna del cuadro 2). En la tercera fase esta disminución persiste en dos sujetos del grupo control y solo en uno del experimental, no existiendo ninguna diferencia para el resto de los sujetos. Es decir, esta variable mostró un comportamiento similar entre los sujetos controles y los tratados.

Por razones de índole técnica, los registros de PA sólo se realizaron durante las fases 2 y 3, por lo que para esta variable sólo se muestran los cambios encontrados al comparar estas fases. De los sujetos controles, sólo tres mostraron un decremento de la PA. Entre los sujetos experimentales, tres mostraron también cambios significativos, pero dos exhibieron incremento y uno decremento.

2. Resultado del análisis histológico

En todos los sujetos, la extirpación de la porción de arteria lesionada se efectuó a las 48 horas posteriores a la inducción del trombo y aproximadamente cuatro horas posteriores a la administración de una dosis de bromelinas o de solución salina. El análisis histológico mostró que la técnica de inyección de ácido sulfúrico 0.1N produjo principalmente 5 tipos de lesión: necrosis del endotelio, inflamación, infiltración hemorrágica en la pared vascular, ruptura de la lámina elástica interna y trombosis. A excepción de la necrosis de endotelio y de la ruptura de la lámina elástica, estos cambios patológicos fueron variables entre los sujetos de ambos grupos. Todos los animales mostraron necrosis total de endotelio vascular (intimectomía química) en el sitio de lesión, de tal manera que esta no es visible en los cortes. Igualmente, la mayor parte de los cortes mostraron ruptura de la lámina elástica interna. Se observó gran variabilidad en relación con el grado de trombosis. Esta

varió de la presencia de un trombo incipiente mal organizado y focal, que posiblemente producía una ligera o nula obstrucción de la luz del vaso hasta una trombosis bien organizada y extensa que sugirió una obstrucción total de la luz del mismo. Se decidió cuantificar porcentualmente estos cambios patológicos, de esta forma: si la inflamación abarcaba el 25% de la circunferencia interna del vaso se le asignaba una cruz (+), si la inflamación afectaba el 50% se le atribuían dos cruces (++) y así sucesivamente.

De forma similar se procedió con la infiltración hemorrágica. Los valores asignados para la formación trombótica fueron de una + (25%) si el trombo era incipiente y focal; ++ (50%) cuando se trataba de trombos incipientes extensos; +++ (75%) en el caso de trombos organizados focales y de ++++ (100%) para trombos organizados y extensos. El cuadro 3 muestra en forma resumida los hallazgos observados en el análisis histológico de todos los sujetos. En forma general, se observan porcentajes más bajos de cambios patológicos en los sujetos que fueron tratados con la dosis única de bromelinas, sin embargo, la aplicación de la prueba estadística no paramétrica U de Mann Whitney no reveló diferencia significativa entre los sujetos controles y los tratados.

Discusión y Conclusiones

Las variaciones en los diferentes animales controles y experimentales, son de tal magnitud que es conveniente analizarlas por separado y su discusión se centrará en el análisis individual; sin embargo, algunos resultados de las variables fisiológicas muestran tendencia que parecen estar de acuerdo con el planteamiento teórico de grupo. Se han descrito cambios en la fisiología cardiovascular por efecto del grado de anestesia (23). Este factor es particularmente importante en la respuesta individual y en situaciones experimentales en las que fue necesario registrar por varias horas. Además la anestesia, al modificar los reflejos neurohumorales, puede influir sobre el tono muscular y sobre los posibles efectos inducidos por el trombo.

Ninguno de los animales mostró signos evidentes de respuesta al dolor. Es importante mencionarlo, puesto que se ha descrito que entre las respuestas al dolor están las del sistema nervioso autónomo que alteran de alguna forma el riego sanguíneo

(24). Otros factores muy difíciles de controlar y que pudieron contribuir a la variabilidad de los resultados obtenidos son: la raza, la edad, el tamaño y la condición física (25). Particularmente importante, por las variables registradas, es el grado de vascularización y revascularización funcional de las extremidades en que se efectuaron los registros.

En la RGP, en cinco sujetos se obtuvo un valor promedio mayor en la segunda fase con relación a la primera, lo que parece coincidir con la suposición de que al disminuir el riego sanguíneo por la trombosis, aumenta el valor de RGP. En los sujetos restantes el valor promedio de RGP en la segunda fase fue significativamente menor que la primera. Esto podría relacionarse a que el área en donde se colocaron los electrodos correspondió a una de mayor vascularización colateral y a que en el animal anestesiado en el que disminuyen las acciones "tónicas simpáticas", puede aumentar la irrigación (26), presentándose entonces una disminución de la RGP. Al relacionar los resultados electrofisiológicos con los histológicos correspondientes se observa que los que presentaron un mayor valor de RGP tenían una trombosis mínima de 75% en cuatro de los cinco sujetos. Por otro lado, de los cinco que mostraron menor promedio de RGP en la segunda fase, cuatro de ellos mostraron trombosis máxima de 50%. Además, los animales controles que presentaron mayor RGP en la fase 2 persistieron en un mayor aumento durante la fase 3. Mientras que, los sujetos tratados con BRO que mostraron mayor RGP en la fase 2 en uno persistió el aumento y en el otro se invirtió dicha respuesta. En los sujetos tratados y con trombosis máxima de 50% también se invirtió la respuesta. Con base en esto podemos inferir: a) la lesión ocasionada en la pared vascular indujo en forma definida un aumento o una disminución en el valor de RGP que dependió del grado de trombosis; y b) el tratamiento con BRO produjo en esta variable una inversión de la respuesta, sólo cuando el grado de la trombosis era de un máximo de 50%.

En relación con la variable de flujo sanguíneo la disminución post-trombótica más importante se presentó en sujetos con un grado de trombosis que varió entre 50 y 100% (cuadro 2 y 3). Esta observación está de acuerdo con lo observado por Gerts et al (27), quienes demostraron que es necesaria una reducción mayor del 60% en el diámetro de un vaso arterial para que se produzca una reducción cuantificable del flujo distal. Por otro

CUADRO 3.

Sujeto	Extensión de la inflamación	Penetración de la inflamación	infiltración hemorrágica	Grado de trombosis
1 C	++++	+++	++	++++
2 C	++	+	+	+++
3 C	++++	+++	++	++
4 C	+++	++++	++	++
5 C	+	++	++	+++

1 B	++++	++	++	+++
2 B	+	++	++	++++
3 B	++	++	+	++
4 B	++++	+++	++++	++
5 B	+	+	+	+

lado, el 22% de los sujetos mostraron, contradictoriamente, un incremento post-trombótico del flujo. Este efecto podría explicarse por un cambio en la velocidad del flujo al disminuir el diámetro efectivo del vaso, lo cual produciría un incremento en la velocidad del flujo, con lo que éste tendería a mantenerse constante o aumentar a pesar de este grado de obstrucción. Igualmente, otro aspecto es el grado de vasodilatación distal que se puede presentar por acción de la trombosis, efecto que es mediado por el sistema nervioso simpático y por factores metabólicos locales, situación en la cual los valores de flujo podrían verse aumentados (26, 28, 29). En cuanto a la fase 3 los sujetos controles mostraron una gran variabilidad, sin ninguna tendencia definida hacia el aumento o disminución. En las gráficas correspondientes (figs. 1-4) se observa una tendencia al ascenso hacia el final de la fase 3 en cuatro de los cinco sujetos tratados con BRO, (1B, 3B, 4B y 5B) pero tal tendencia no es significativa estadísticamente en relación con la fase 2. Se aplicó la prueba estadística de regresión múltiple con los datos de la tercera fase en los animales controles y tratados con BRO. Para ello se consideró como variable dependiente los valores del flujo. En los controles el análisis de regresión múltiple contra frecuencia cardíaca (FC) y el grado de trombosis mostró la existencia de un coeficiente de determinación de 0.998. Es decir, que se

puede afirmar que el 99% de los cambios en el flujo se pueden explicar por la acción simultánea del grado de trombosis y de la FC en el rango de resultados de la tercera fase de los sujetos controles. Al aplicar esta prueba en la fase 3 para las mismas variables en los sujetos tratados, el coeficiente de determinación resultó ser 0.78. Es decir que la correlación se reduce hasta el 78% en los sujetos experimentales lo cual sugiere cierto afecto del tratamiento. Es posible que de prolongarse las observaciones o de incrementarse el tratamiento, esta correlación de los cambios en el flujo producidos por el trombo podría aclararse aun más. Cabe recordar que el final de la fase 3 corresponde a los registros obtenidos tan sólo 4 horas después de la dosis única de BRO. Además, estos sujetos mostraron según el análisis histológico, grados de trombosis entre el 25 y el 75%.

Para el TP y la TD, los cambios inducidos por el trombo así como por el tratamiento no fueron constantes, pero la tendencia más frecuentemente observada por efecto del trombo, en los dos grupos de animales fue el aumento de ambas temperaturas. En la tercera fase, a diferencia del grupo control, el 80% del grupo experimental mostró un aumento de TP y un efecto no claro en la TD, sin embargo, según el análisis de regresión múltiple en el grupo control, considerando a la TD como variable dependiente y a los cambios el flujo y al grado de trombosis como variables independientes, se encontró un coeficiente de determinación de 0.72, lo cual indica que el 72% de los cambios de TD pueden ser explicados con base en los cambios de flujo y del grado de trombosis, considerándolos simultáneamente. Cuando el mismo análisis se aplicó en el grupo experimental, el coeficiente resultó ser de 0.15, con lo cual parece ser que los cambios de TD, ahora no son bien explicados por los mismos parámetros independientes (flujo y trombosis) en este grupo de sujetos, lo cual podría sugerir un efecto del tratamiento sobre el grado trombosis o sobre el flujo. Considerando la buena correlación lineal existente entre la TP y la TD, se apoya el concepto de que la vascularización colateral subsecuente a la trombosis (30) jugó un papel importante en el mantenimiento de dichas temperaturas y posiblemente en el comportamiento de otras variables.

En relación con la FC, la comparación de la fase 1 y 2 resultó en que los cambios significativos se distribuyeron uniformemente en todos los su-

jetos (tres mostraron aumento, tres disminución y tres no cambiaron). Además, entre las fases 2 y 3 tampoco se observó una respuesta definida hacia alguno de los cambios mencionados considerando ambos grupos. Podemos inferir que el factor primordial para este comportamiento de la FC, al igual que en el caso de la FV es el nivel de anestesia alcanzado y sostenido en cada animal.

La variabilidad que presentaron los registros de FV fue mínima en cada una de las fase, lo cual se manifiesta en los pequeños valores de la desviación estándar de ellas. Sin embargo existieron diferencias al comparar las tres fases, especialmente, entre las fases 1 y 2 en todos los sujetos. Esta comparación mostró que en el 70% de los sujetos, la FV fue estadísticamente diferente en la sesión realizada 48 horas después de la inducción del trombo. Al comparar las fases 2 y 3, ahora el 70% de los sujetos no muestran diferencias de los promedios. Una posible explicación a los cambios que presentó esta variable entre las fases 1 y 2 es el nivel de anestesia. Debemos recordar que transcurrieron 48 horas entre estas dos fases, lo que representa dos sesiones quirúrgicas y dos inducciones de anestesia diferentes. Bajo estas consideraciones y del conocimiento de los efectos del nivel de anestesia en los procesos de regulación de la ventilación podemos suponer que estas respuestas no se vieron influenciadas por la lesión arterial infligida ni por la administración de solución salina o de BRO. Posiblemente, entonces, el aspecto más importante de la variabilidad fue el grado de anestesia con que los sujetos iniciaban las sesiones experimentales.

La PA presentó un coeficiente de correlación simple con la FC de 0.64 y 0.71 para los sujetos controles y tratados con BRO respectivamente durante la fase 3. El 75% de los sujetos controles presentaron disminución de la PA en la fase 3 y el restante 25% no mostró cambios significativos al compararse con la fase 2. En los sujetos tratados con BRO sólo el 20% mostró un decremento de la PA. Los restantes se distribuyeron por igual entre un aumento y ningún cambio al comparar esas mismas 2 fases. Se ha descrito (8,31) que la administración de BRO por vía I.V. provocó disminución de la PA y aumento de la FC en perros y ratas. La duración de los efectos dependió de la rapidez de administración de las BRO. Los autores demostraron que este aspecto hipotensor es debido a la activación del sistema precalicreína-cinina a través de la

activación del factor de Hageman inducido por las BRO (31). En el presente experimento tal efecto hipotensor no se observó. Por el contrario el 50% de los sujetos tratados con BRO que mostraron un cambio significativo presentaron un claro aumento de la PA. En el restante 50% el aumento no es significativo (cuadro 2). Estos resultados sugieren que los sujetos tratados con BRO mantuvieron niveles más sostenidos de PA (insinuando tendencia al aumento) en el transcurso del experimento a diferencia de los sujetos controles, en los cuales prevaleció el decaimiento progresivo de los valores de esta variable.

Los resultados histológicos mostraron la efectividad del método para causar daño endotelial (fig. 5) pues todos los sujetos mostraron intimec-

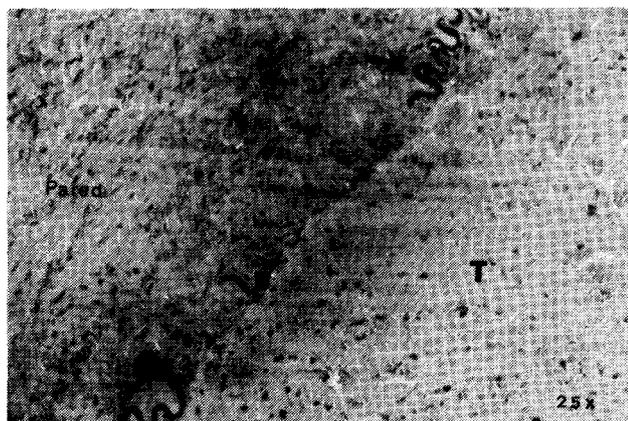


Fig. 5. Microfotografía de un corte transversal de una arteria femoral lesionada. No se observan estructuras más internas (endotelio) de la lámina elástica interna (→), la cual aparece interrumpida, se presenta trombosis sobre la pared vascular (T) (Tinción de Verhoeff).

tomía total de la porción arterial que se puso en contacto con la solución ácida. Se conoce que uno de sus factores más importantes para la inducción de trombosis es el daño endotelial, el cual se acompaña de la agregación de plaquetas y de la activación de la coagulación, resultando la formación de un trombo constituido principalmente de plaquetas, fibrina y leucocitos (27). El extenso daño endotelial causado por el ácido fue el estímulo iniciador de la formación de trombos. Sin embargo, como se observa en el cuadro 3, existió variabilidad en el grado de la trombosis obtenida a las 48 horas aunque con cambios histo-patológicos menores en los animales tratados con BRO

(fig. 6). En resumen, estos resultados histológicos aunados a los electrofisiológicos sugieren cierta influencia ejercida por el tratamiento de las enzimas proteolíticas bromelinas en el proceso trombolítico y proponen otros estudios a más largo plazo y con mayores o repetidas dosis (30).

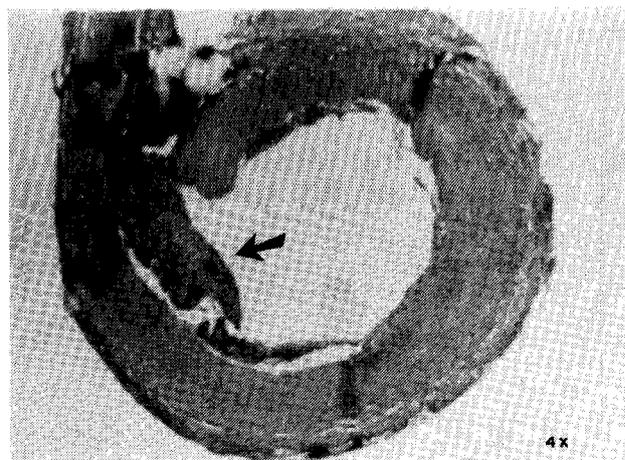


Fig. 6 Microfotografía de un corte transversal de una arteria femoral lesionada. Muestra un pequeño trombo adherido a la pared vascular (Tinción de Hematoxilina-Eosina).

Referencias

1. KHANA, S. et al. Salud en zonas urbanas de América Latina y del Caribe. Bol. Sanit. Panam, 96(2): 134-144, 1984.
2. PAVLOSKY, M. y CARRERAS, L.O. Mecanismos que intervienen en la formación de un trombo. En: Homeostasis y trombosis S. Dorante y J. Pizzuto (eds.), Grupo Cooperativo Latinoamericano de Homeostasis y trombosis, IMSS, México, Pag. 391, 1981.
3. CIRELLI, M. Clinical experience with bromelains in proteolytic enzyme therapy of inflammation and edema. Medical Times, September, 1964.
4. COONEY, D.A. and ROSENBLUTH. Enzymes as therapeutic agents. Adv. Pharmacol. Chdmother, 12:185-289, 1975.
5. MARTIN, G. I. Las enzimas proteolíticas y la inflamación, situación actual. Actas de una reunión internacional acerca de drogas no esteroideas anti-inflamatorias. Excerpta Médica International Congress, Serie Num. 82, Milán, September, 1964.
6. TAUSSIG, S. J. and NIEPPER, H. A. Bromelain: its use in prevention and treatment of cardiovascular disease - Present status, J. of IAPM, 6(1):139-150, 1979.
7. COOREMAN, W. M. et al. Bromelain, Biochemical and Pharmacological properties, Pham. Acta Helv, 51(4): 73-97, 1976.
8. MOSS, J. H. et al. The Pharmacology of the enzymes Arch. Int. Pharmacodyn, 145(1,2):166-189, 1963.

9. ISAKA, K. et al. Gastrointestinal absorption and anti-inflammatory effect of bromelain, Japan, *J. Pharmacol*, 22:519-534, 1972.
10. KARLOF, B. et al. Bromelain a proteolytic enzyme, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg*, 3:27-29, 1969.
11. WOOLF, R. M. et al. Bromelain of a artificially induced hematoma and the influence of the proteolytic enzyme. *The Journal of Trauma*, 5(4):491-494, 1965.
12. ZATUCHNI, G. I. and COLOMBI, D.I. Bromelains therapy for the prevention of episiotomy pain - *Obstet & Ginecol*. 2: 275-278, 1967.
13. HEINICKE, R. M. et al. Effect of bromelain (Ananase) on human platelet aggregation, *Experientia*, 28:844-845, 1972.
14. MORITA, A. H. et al. Chromatographic fractionation and inhibitory factor for bromelain, *Arch. Int. Pharmacodyn, Ther.*, 239(2):340-350, 1979.
15. SMITH, D. D. et al. Sistemic biochemical changes following the oral administration of the proteolytic enzymes, Bromelain, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 136:230-236, 1962.
16. LIVIO, M. et al. Effect of bromelain on fibrinogen level, prothrombin complex factors and platelet agregation in the rat, *Drugs Exptl. Clin. Res.*, 4:49-53, 1978.
17. PIROTTA, F. and DE GIULI-MORGHEN, C. Bromelain. A deeper pharmacological study. Note I. Antiinflammatory and serum fibrinolytic activity after oral administration in the rat, *Drugs Exptl. Clin. Res.* 4(1):1-20. 1978.
18. DE GIULI - MORGHEN, C. and PIROTTA, F. Bromelain. A deeper pharmacological study. Note II. Interaction with some protease inhibitors and rabbit specific antiserum, *Drugs Exptl. Clin. Res.* 4(1):21-37.
19. FELTON, G. E. Fibrinolytic and antithrombotic action of bromelain may eliminate thrombosis in heart patients, *Medical Hypotheses*, 6:1123-1133, 1980.
20. POPESKO, P. Atlas of fotographical anatomy of the domestic animals., Vol. 2th. ed., W. B. Saunders, Co. pp. 182, 1972.
21. SANCHEZ-VILLAREAL, F. et al. Sistema interactivo de análisis bioestadístico (SIAB) - Unidad de computación, Fac. de Medicina, UNAM., México 1983.
22. ZAR, J. H. Biostatistical analysis, chap. 14, Pretice-Hall, englewood cliff., N. J. 1974.
23. MARSHALL, B.E. y WOLLMAN, H. Anestesia general. En: las bases farmacológicas de la terapéutica. A. Goodman. L.S. Goodman y A. Gilman (eds), Cap. 14, 6a. ed., Ed. Médica Panamericana, México, Pag. 297-300, 1981.
24. VIERCK, CH. J. et al. Behavioral analisys of CNS Pathways and trasmitter systems involved in conduction and Inhibition of pain sensations and reaction in primates, *Progress in Psychobiology and Pshysiological Psychology*, 10:113-165, 1983.
25. SCHEVER, J. and TRIPTON, CH. M. Cardiovascular adaptations to physical Training, *Ann. Rev. Pshysiol.*, 39:221-251, 1977.
26. McDONALD, D.A. The measurement of phasic flow velocity, In: Blood flow in arteries, McDonald, D.A. Chap. VI. P.104-128, Monograph of the physiological Soc., No. 7, 1960.
27. GERTZ, S.D. et al. Endothelial cell damage and thrombus formation after partial arterial constriction: Relevance to the role of coronary artery spasm in the pathogenesis of myocardial infartion, *Circulation*, 63 (3):476-486, 1981.
28. BAEZ, S. Microcirculation, *Ann. Rev. Physiol.*, 39:391-415, 1977.
29. FREEMAN, N. E. The effects of temperature on the rate of blood flow in the normal and in the sympathecotomized hand, *Am. J. Physiol.*, 113 (12):384-398, 1935.
30. AMARIS-CASTELLAR, R.A. et al. Análisis angiográfico e histológico de la acción trombolítica de Bromelinas, X Congreso Latinoamericano de Farmacología y Terapéutica, Quito, Ecuador, Nov. 18-23, 1984.
31. OH-ISHI, S. et al. Bromelain, A thiolprotease from pineaple stem, depletes haigh molecular weight kinonogen by activation of Hageman factor (factor XII), *Throm. Res.*, 14:665-627, 1979.

Agradecimientos

Dr. Alberto Soliz L. de G. Director Médico de Laboratorios Rorer de México. Dr. Joaquín Carrillo Departamento de Histología - Fac. de Medicina, UNAM. Dr. Héctor A. Rodríguez N. Departamento Patología. Fac. de Medicina, UNAM. Miembros Unidad de Computación. Fac. de Medicina, UNAM. Miembros Bioterrio, Div. de Investigación, Fac. de Medicina, UNAM. Dr. Luis A. Marquez. Departamento Técnicas Quirúrgicas, Fac. de Medicina, UNAM.