

Evaluación fenotípica de la respuesta a antidepresivos: cumplimiento, relación con eficacia y efectos adversos

J.R. Azanza

Servicio de Farmacología Clínica
Clínica Universidad de Navarra

FUNDAMENTO

Actualmente, el interés médico por alcanzar un tratamiento efectivo, con nula toxicidad, es incuestionable. La variabilidad en la capacidad de las distintas enzimas implicadas en el metabolismo de los fármacos da lugar a grandes diferencias en la capacidad metabólica inter e intraindividual. En este sentido, cada vez más, se están aprovechando los recursos que la genética pone a disposición de los profesionales. Pero es posible obtener los mismos resultados con otras técnicas de análisis. Los procedimientos de fenotipaje pueden ayudar a caracterizar la población en distintos grupos, asociados a un determinado comportamiento frente a un fármaco.

En este estudio se pretende conocer la farmacocinética de venlafaxina y paroxetina y de sus metabolitos principales para, a partir de la relación establecida entre ambos, poder establecer el tipo de paciente, en función de cómo maneja estos fármacos, y evitar la toxicidad o la ineficacia del tratamiento. La aplicación de tests de fenotipaje basados en el análisis del índice metabólico del propio fármaco puede ayudar de una forma sencilla, fiable y con un coste asumible a evaluar las características genéticas de cada individuo. A este respecto, se podría predecir qué fármacos antidepresivos y qué dosis pueden ser eficaces en un paciente determinado, y en qué casos se pueden manifestar efectos secundarios, así como la posible ineficacia del tratamiento tras la administración de las primeras dosis del fármaco, permitiendo el reajuste del mismo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron pacientes (hombres y mujeres) en tratamiento con venlafaxina o paroxetina, de edad comprendida entre los 18 y 70 años, peso dentro de los límites del 15% del peso ideal, que habían otorgado por escrito su consentimiento a participar en el estudio después de haber recibido toda la información del mismo. Se excluyeron aquellos pacientes con antecedentes de hepatopatía, alteración de la función renal (aclaramiento de creatinina >70 ml/min) o en la absorción (gastrointestinales o malabsorción).

Se desarrollaron dos técnicas de análisis para determinar la concentración de paroxetina, venlafaxina, 4-hidroxy-3-metoxi-paroxetina y O-desmetilvenlafaxina, inicialmente por HPLC-UV y después con detección MS/MS.

Se aplicaron modelos no compartimentales, mediante el programa de farmacocinética Winonlin versión 5.2 Professional, para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos a partir de las concentraciones plasmáticas de paroxetina, 4-hidroxi-3-metoxi-paroxetina, venlafaxina y O-desmetil-venlafaxina. El cálculo del cociente metabólico se ha realizado con la siguiente fórmula: $\text{Log AUC}_{\text{farmaco}} / \text{AUC}_{\text{metabolito}}$

En este momento se están realizando análisis multivariantes y poblacionales.

RESULTADOS

Se han recogido muestras procedentes de 61 pacientes, 18 de ellos en tratamiento con paroxetina, 43 con venlafaxina y 4 en tratamiento con ambos fármacos. Diecinueve eran varones y 46 mujeres.

Los pacientes en tratamiento con paroxetina recibían dosis entre 10 y 40 mg diarios, con venlafaxina las dosis oscilaron entre 75 y 375 mg diarios.

La concentración media de venlafaxina antes de la administración de una nueva administración, relativizada con la dosis, fue de $0,511 \pm 0,5$ ng/ml/mg. El rango de valores osciló entre 0,016 y 2,131 ng/ml/mg. La concentración media de paroxetina antes de la administración de una nueva administración, relativizada con la dosis, fue de $1,778 \pm 2,156$ ng/ml/mg.

En el caso de paroxetina el 24% de los pacientes presentaron un cociente metabólico que correspondería a metabolizadores lentos. En el caso de venlafaxina este porcentaje ascendía al 82%. Queda por definir el origen de este cociente, su relación con el genotipo (con la financiación obtenida únicamente se ha podido determinar el genotipo en 15 pacientes) o con la administración de medicación concomitante que inhiba a la isoenzima CYP2D6.

DISCUSIÓN

La determinación analítica de la concentración de paroxetina y venlafaxina en las muestras de plasma se realizó inicialmente mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta y de fluorescencia.

A pesar de que los métodos desarrollados fueron adecuados para cuantificar paroxetina y venlafaxina en la mayor parte de las muestras extraídas en los pacien-

tes, se encontró que un elevado número de muestras presentaba concentraciones de los metabolitos por debajo del límite de cuantificación de las técnicas analíticas. Por tanto, fue necesario desarrollar nuevos procedimientos analíticos utilizando un sistema de detección más sensible, la espectrometría de masas/masas.

El procedimiento desarrollado fue adecuado para permitir la cuantificación paroxetina, venlafaxina y sus metabolitos 4-hydroxy-3-methoxy-paroxetina y O-desmetil-venlafaxina con un valor de límite de cuantificación (0,5 ng/ml) adecuado y suficiente para estudiar la evolución durante 24 horas de la concentración de paroxetina, venlafaxina, y los metabolitos seleccionados en pacientes tratados con estos fármacos.

En los datos farmacocinéticos obtenidos de las muestras analizadas se observa una gran variabilidad.

Dicha variabilidad se debe en parte al genotipo metabolizador de los pacientes, pero no pueden descartarse otros factores implicados como la posible interacción con medicación concomitante. Estos y otros son factores que están por determinar en el momento actual, ya que requieren una revisión con profundidad de los datos, que ha empezado a realizarse y de cuyos resultados se informará puntual y detalladamente.

Con estos resultados puede concluirse que es preciso utilizar técnicas de espectrometría de masas para lograr cuantificar adecuadamente las concentraciones de los metabolitos.

Además queda claro que existe una gran variabilidad interindividual cuyo origen es genotípico y fenotípico, que en la actualidad se está evaluando con detalle (análisis multivariante y poblacional).

Evaluación de los trastornos de personalidad: comorbilidad y validez de los instrumentos utilizados en nuestro medio

F. Lahortiga

Clínica Universidad de Navarra

La elevada prevalencia de trastornos de la personalidad (TP) en pacientes psiquiátricos (30-50% en ambulatorios y 50-60% en ingresados), y la influencia que ejerce su diagnóstico en la evolución y el pronóstico de otras patologías del Eje I, incrementan el interés en su detección temprana y en disponer de procedimientos eficaces y sencillos para su evaluación. En nuestro medio, son muy escasas las investigaciones dirigidas a analizar las propiedades psicométricas de los instrumentos que utilizamos y menos aún a conocer empíricamente cuál de ellos proporciona una evaluación más fidedigna del diagnóstico de TP. Los objetivos planteados en la presente investigación han sido los siguientes:

1. Investigar qué instrumento de evaluación dimensional autoaplicado (cuestionario), de los empleados usualmente en la práctica clínica, es más idóneo en nuestro medio, para diagnosticar la presencia/ausencia de TP así como para diagnosticar los subtipos específicos de TP.
2. Inferir qué combinación de los rasgos estudiados en cada cuestionario caracteriza mejor a los distintos subtipos de TP.

Además de estos dos objetivos principales, en el presente estudio se plantearon también los siguientes objetivos:

3. Estudiar la posible asociación entre TP (Eje II) y trastornos clínicos (Eje I), analizando qué tipos de TP se asocian con las patologías específicas del Eje I más prevalentes en nuestro estudio.
4. Analizar la posible asociación entre presencia de TP y frecuencia en el diagnóstico de enfermedades médicas del Eje III de la DSM-IV-TR que presentan nuestros pacientes.

Se diseñó un protocolo para la recogida de los datos de filiación del paciente, características sociodemográficas y clínicas. El diagnóstico en el Eje I se realizó según los criterios establecidos por la DSM-IV-TR. El diagnóstico en el Eje II se recogió como una variable cualitativa dicotómica (sí/no) según las categorías consideradas en la clasificación DSM-IV-TR. Previamente a su inicio, el estudio recibió la autorización para su realización por parte del Comité de Ética de la Clínica Universitaria.

Los pacientes fueron atendidos en el Departamento de Psiquiatría y Psicología Médica de la Clínica Universitaria, en régimen de consultas externas u hospitalización y debían cumplir una de las siguientes características:

- Ser pacientes con trastorno de personalidad y alguna patología comórbida del Eje I.
- Ser pacientes con trastorno de personalidad sin patología del Eje I.
- Ser pacientes sin trastorno de personalidad con alguna patología del Eje I.

Los criterios de exclusión del estudio fueron los siguientes:

- Presentar un C.I. menor de 80, según el Test de Raven, por la posible dificultad para comprender los enunciados de los cuestionarios.
- Encontrarse afectado, durante la participación en el estudio, por un episodio psicótico o algún otro estado que pudiera alterar su juicio de realidad.
- Reticencia a participar (si existían dudas en el paciente, a pesar del cumplimiento de los criterios de inclusión, no se insistía en su participación).
- Ser menor de 18 ó mayor de 60 años.

- Presentar una patología orgánica que diera lugar a manifestaciones sintomáticas susceptibles de ser confundidas con rasgos patológicos de la personalidad.

Los sujetos que forman parte del estudio siguieron un muestreo de conveniencia. Se fueron incluyendo de manera progresiva, no aleatorizada, según aceptaban o no participar en el estudio, firmaban el consentimiento informado y terminaban de completar todas las pruebas. Para evitar la variabilidad intraindividuos, la realización del estudio se llevó a cabo en un intervalo entre uno y siete días. Por último, se llevó a cabo la entrevista diagnóstica de trastorno de personalidad IPDE, módulo DSM-IV.

A todos los pacientes se les aplicaron las siguientes pruebas: Test de inteligencia general de Raven, cuatro cuestionarios de personalidad autoaplicados: TCI de Cloninger, MCMI-II de Millon, MMPI-2 de Hathaway y Mc Kinley y cuestionario de cribado IPDE de Loranger, según el módulo DSM-IV, y entrevista semiestructurada IPDE de Loranger, según el módulo DSM-IV, que sirvió como "criterio oro" para el establecimiento del diagnóstico de TP. La base de datos se elaboró mediante el programa SPSS versión 13.0.

La muestra de pacientes estaba compuesta por 188 sujetos (72 varones y 116 mujeres), con una edad media de 34,8 años, de los cuales 72 cumplieron criterios completos IPDE de TP, 85 no los cumplieron y 31 cumplieron criterios parciales (posible trastorno de personalidad); las mujeres presentaban más diagnósticos de TP (42,2% de los casos).

El TP No Especificado fue el más frecuente (33,3%), seguido del Evitativo (22,2%) y del Límite (12,5%). Los sujetos del grupo con TP presentaban mayor número de hospitalizaciones psiquiátricas, mayor número de puestos de trabajo tras finalizar los estudios y menos noviazgos.

El 84,6% de los sujetos presentó algún diagnóstico de patología del Eje I, siendo el más habitual los trastornos del estado de ánimo. Este diagnóstico no se asoció a la edad ni al sexo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la presencia de patología del Eje I en los diferentes grupos de trastornos del Eje II.

El 63,3% de los pacientes presentaron además una patología del Eje III (enfermedades médicas) con una mayor prevalencia entre las mujeres (65,7%). Aunque los sujetos con TP presentaban mayor prevalencia de patología del eje III (68,1%), frente a los sujetos sin TP (60%), no se encontraron diferencias significativas (Ji cuadrado $p=0,564$)

Al comparar los perfiles obtenidos en los cuestionarios dimensionales, observamos que el perfil promedio más elevado fue el del grupo que cumplía criterios diagnósticos completos de TP y el menos elevado el de los pacientes sin TP, mientras que los que cumplían criterios parciales ocuparon una posición intermedia (prueba de Kruskal-Wallis). Al comparar los grupos dos a dos, el mayor número de diferencias estadísticamente significativas aparecieron en la comparación entre los grupos con/sin TP. En la actualidad, se están llevando a cabo análisis multivariantes dirigidos a determinar qué combinación de las escalas de los instrumentos de evaluación dimensionales utilizados resulta más idónea para valorar la presencia de un TP, comprobando previamente si los valores de los análisis cambian o no al ajustarlos por posibles variables confusoras (edad, sexo y presencia de patologías del Eje I y Eje III).

Las conclusiones que se pueden derivar de los resultados obtenidos hasta la fecha son las siguientes:

1. Más de la tercera parte de los pacientes estudiados cumplieron criterios completos de TP, siendo este diagnóstico más frecuente en las mujeres.
2. Los TP más prevalentes fueron el No especificado, el Evitativo y el Límite.
3. Encontramos una alta comorbilidad entre patologías del Eje II-Eje I y Eje II-Eje III.
4. Existen claras diferencias en los perfiles obtenidos en los instrumentos de evaluación dimensionales entre pacientes con/sin TP y además los resultados parecen reflejar que estos instrumentos dimensionales son sensibles a la detección de la magnitud del trastorno.
5. Los resultados obtenidos en los perfiles apoyan el concepto de dimensionalidad del diagnóstico de TP.

Determinantes nutricionales de la incidencia de hipertensión y diabetes en una cohorte prospectiva

M. A. Martínez González

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública
Universidad de Navarra

RESUMEN

La dieta mediterránea (DMed) como paradigma de alimentación saludable es un modelo cada vez mejor valorado en salud pública. Con la excepción del ensayo PREDIMED, que valora dieta y enfermedad coronaria (RTIC 06/0045), son escasos los estudios rigurosos so-

bre este tema en nuestro país. El estudio SUN (cohorte prospectiva dinámica iniciada en 2000) está suponiendo una oportunidad incomparable para valorar con mayor especificidad los posibles efectos favorables de la DMed y sus elementos más típicos sobre la obesidad, la incidencia de hipertensión arterial (HTA), el síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Los obje-

tivos específicos de este proyecto fueron el análisis de los siguientes aspectos

- Protección de la DMed frente a HTA y DM2.
- Papel del aceite de oliva, fruta y vino tinto sobre la incidencia de HTA y DM2.
- Efecto de la carga glucémica en la DMed sobre incidencia de HTA y DM2.

Métodos. Más de 20.000 graduados universitarios han completado la evaluación basal (incluyendo cuestionario de consumo de alimentos validado en España), 13.761 de ellos han completado el seguimiento a 2 años; 10.157 a 4 años; 6.694 a 6 años; y 1.183 a 8 años. Estas respuestas suponen aproximadamente un 90% de retención de quienes llevaban el tiempo pertinente en la cohorte y ya habían completado el ciclo de envíos solicitando su respuesta a los cuestionarios. Se han alcanzado >63.000 personas-años de seguimiento a fecha 10-07-2008. Se han validado las mediciones de las exposiciones principales y los diagnósticos médicos auto-declarados de HTA y se han recogido cuestionarios adicionales e informes médicos de los pacientes que han desarrollado DM2 (casos incidentes). Para cada falleci-

miento se solicitan las historias clínicas y/o informes anatomopatológicos previo permiso del paciente más próximo. Los diagnósticos siempre han sido confirmados por un médico del equipo investigador.

Resultados. Se han publicado 19 artículos en revistas con revisión por pares (pueden encontrarse a texto completo en www.unav.es/preventiva/sun/pagina_2.html). Todos son trabajos originales de investigación, salvo un artículo metodológico específico (Int J Epidemiol 2006; 35: 1417-1422). Todos, salvo uno (Rev Esp Cardiol 2006; 59: 1331-1334), fueron publicados en revistas internacionales. Todas las revistas son de alto índice de impacto. Lo más destacable de los resultados es que se ha encontrado un fuerte papel protector de la dieta mediterránea frente a la diabetes tipo 2 (BMJ 2008; 336: 1348-1351) y frente al síndrome metabólico (Diabetes Care 2007; 30: 2957-2959).

Conclusiones. La cohorte SUN puede considerarse consolidada, pues va produciendo resultados reconocidos internacionalmente del máximo interés para la salud pública. Este extraordinario registro de publicaciones de alto impacto avala el futuro del proyecto SUN.

Una nueva isoforma truncada del receptor endotelial de la proteína C: factor de riesgo trombótico y marcador plasmático en determinadas neoplasias

R. Montes Díaz

Fundación para la Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra

FUNDAMENTO

Hasta ahora, el origen de la forma soluble del receptor endotelial de la proteína C (EPCR) se atribuía exclusivamente a la acción de una metaloproteínasa activada por la trombina. En nuestro laboratorio se detectó una nueva isoforma de EPCR que se genera por *splicing* alternativo en cDNA de líneas neoplásicas, forma truncada, carente de dominio transmembrana y cola intracitoplasmática, por lo que se predice que sea soluble y por tanto circulante. Este EPCR truncado (sEPCRtr) podría interferir en el mecanismo de activación y bloquear la actividad anticoagulante de la proteína C, por lo que podría jugar un papel protrombótico.

Este trabajo se propone expresar dicha isoforma para caracterizarla bioquímicamente y así ver si exhibe las propiedades mencionadas. Además, se pretende diseñar un inmunoensayo para detectar al sEPCRtr en sobrenadantes de cultivos de células humanas y demostrar así que el cDNA que hemos identificado lleva a término la traducción a proteína.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de la isoforma truncada del EPCR (sEPCRtr)

El sEPCRtr se ha clonado en el vector pPICZ α C y con él se ha transformado la levadura *Pichia pastoris*. La

proteína se purificó por FPLC: interacción hidrofóbica, intercambio iónico y afinidad con EPCR.

Caracterización bioquímica de sEPCRtr

La afinidad del sEPCRtr por la proteína C se estudió por *surface plasmon resonance* en el equipo Biacore X (Biacore, Suecia). Para ver el efecto de sEPCRtr sobre la activación de la proteína C se empleó la línea endotelial EA.hy926, incubada con trombina y proteína C en presencia o ausencia de sEPCRtr. La actividad de la proteína C activada (PCA) se valoró con el sustrato cromogénico S-2366. También se estudió el papel del sEPCRtr sobre el efecto de la PCA en la coagulación empleando el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA).

ELISA para determinar los niveles de sEPCRtr

Se inmunizaron ratones BALB/c hembra de seis semanas con sEPCRtr. Se controló la eficacia de la inmunización mediante ELISA. Se sacrificó a los animales correctamente inmunizados y se les extrajo el bazo como fuente de células plasmáticas que posteriormente se fusionaron con células de mieloma murino para la generación de hibridomas. De los anticuerpos monoclonales obtenidos, se seleccionaron los que reconocían exclusivamente al sEPCRtr y no a la

forma *wild-type* (mediante un doble ELISA con ambas isoformas). Dos de ellos, MAVE-1 y MAVE-3, se eligieron para poner a punto un ELISA tipo sandwich para medir los niveles de sEPCRtr. Se midieron mediante este ensayo los niveles de sEPCRtr en los sobrenadantes de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón (A549 y H1264).

MAVE-3 se empleó también para detectar sEPCRtr por *Western blot* en el medio de células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC).

RESULTADOS

Propiedades del sEPCRtr

El estudio bioquímico reveló que el sEPCRtr se comporta de modo similar a la forma soluble *wild-type*: ambas isoformas presentan una afinidad similar por la proteína C e interfieren en igual medida en la activación de ésta por trombina sobre las células endoteliales así como en el efecto de la PCA en el tiempo de coagulación (Fig. 1, A-C).

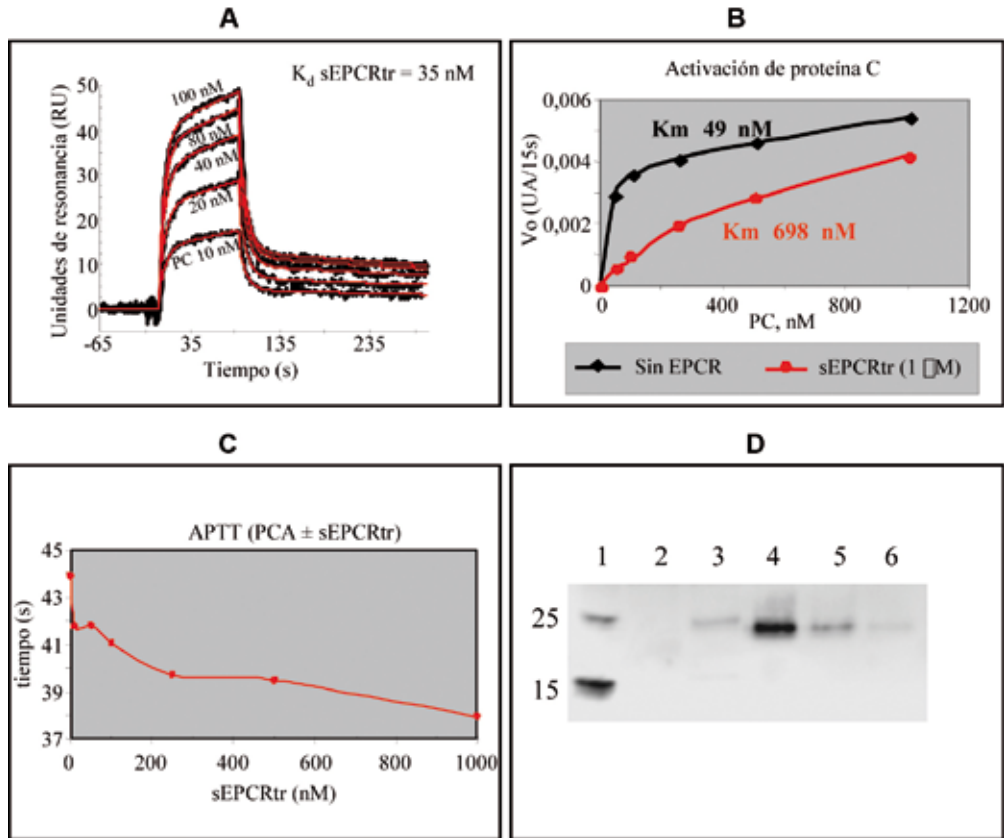


Figura 1. A. Afinidad de sEPCRtr por la proteína C mediante surface plasmon resonance: se añadieron cantidades crecientes de proteína C sobre un chip con sEPCRtr y se estudió el perfil de asociación y disociación de la interacción. Se calculó una K_d de 35 nM, similar a la de la proteína C con la isoforma *wild-type* del EPCR (PC, proteína C). B. Interferencia de sEPCRtr en la activación de la proteína C: se calculó la velocidad inicial (V_o) de la activación de concentraciones crecientes de proteína C por 0,02 U/mL de trombina sobre 50.000 células endoteliales, en presencia y en ausencia de 1 μ M de sEPCRtr. Con las V_o se calculó la K_m de activación, que empeoraba unas 14 veces con sEPCRtr (PC, proteína C; UA, unidades de absorbancia a 405 nm). C. Efecto del sEPCRtr en un tiempo de coagulación: se añadieron concentraciones crecientes de sEPCRtr a plasmas a los que se había añadido PCA y a los que se recalificó para comprobar el tiempo que tardaban en coagular. La adición de sEPCRtr redujo el efecto alargador de la PCA sobre el tiempo de coagulación. D. Detección de sEPCRtr por *Western blot* con el anticuerpo monoclonal MAVE-3, específico para esta isoforma, en el sobrenadante, previamente deglicosilado, de un cultivo de HUVEC. Números de la izquierda: pesos moleculares en kDa. Columnas: 1, estándares de peso molecular; 2, medio de cultivo deglicosilado; 3, medio de cultivo deglicosilado de un cultivo de HUVEC; 4, 5, y 6, sEPCRtr recombinante deglicosilado a 10, 5 and 2,5 nM respectivamente. Se observa cómo la banda correspondiente al sEPCRtr recombinante coincide con la observada al correr la muestra del medio de cultivo de las células HUVEC.

Detección de sEPCRtr por ELISA

Detectamos sEPCRtr en el sobrenadante de dos líneas celulares de cáncer de pulmón, A549 y H1264, de las que ya habíamos visto expresión en cDNA, confirmando que el *splicing* alternativo llega finalmente a traducirse a proteína, y que ésta realmente existe y es detectable en neoplasia. En concreto, detectamos sEPCRtr a $0,27 \pm 0,08$ y $0,41 \pm 0,3$ nM respectivamente en A549 y H1264 (aproximadamente el 7 y el 26% del EPCR soluble total).

Detección de sEPCRtr por Western blot

Fuimos capaces también de detectar la presencia de sEPCRtr en sobrenadantes de células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) (Fig. 1 D).

CONCLUSIÓN

Hemos caracterizado bioquímicamente una nueva isoforma del EPCR que se genera por *splicing* alternativo. La isoforma sEPCRtr corresponde a la forma soluble del receptor, íntegra, más una pequeña fracción correspondiente a la región 3' no traducida. Ésta, como era de esperar, es una isoforma soluble. Al ser idénti-

ca a la región soluble del EPCR *wild-type*, se comporta bioquímicamente como la fracción soluble proveniente del citado EPCR *wild-type* (hasta ahora se creía que este último era la única fuente de EPCR soluble). Es decir, ambas isoformas tienen una afinidad similar por la proteína C, ambas dificultan de igual modo la activación de la proteína C sobre la superficie del endotelio y ambas interfieren de modo similar en el efecto anticoagulante de la proteína C.

Demostramos además la existencia real de sEPCRtr. Hasta este momento habíamos visto su presencia sólo como cDNA, ya que los estudios bioquímicos los habíamos realizado con la molécula expresada en el laboratorio. Con la puesta a punto del ELISA gracias a los anticuerpos monoclonales que desarrollamos, detectamos la proteína en el sobrenadante de células de cáncer de pulmón, en coherencia con la detección en dichas células, previamente, de cDNA. Vimos también por *Western blot* sEPCRtr en el sobrenadante de células endoteliales. En conjunto, los resultados de este proyecto aportan nueva luz acerca de la procedencia del EPCR soluble circulante y abren la puerta a estudios en los que valorar más finamente el papel protrombótico del sEPCRtr en diversas patologías (a día de hoy, se discute si formas solubles del EPCR son capaces de jugar un papel protrombótico activo).

Evaluación de las otoemisiones acústicas automáticas como test de screening en un programa poblacional de detección precoz de la hipoacusia neonatal

N. Ascunce¹, M. Ederria¹, A. Barcos¹, N. Erdozain¹, M. García López¹, J. Zubizaray²

1. Instituto de Salud Pública. Servicio Navarro de Salud-Osasunbidea.
2. Servicio de Otorrinolaringología. Hospital Virgen del Camino. Pamplona.

FUNDAMENTO

La hipoacusia neonatal constituye un problema de gran importancia, tanto para la persona que la sufre como para su familia y la sociedad en general. Cuando no se diagnostica e interviene sobre ella precozmente puede alterar de forma importante el desarrollo cognitivo y del lenguaje del niño, así como su adaptación social.

Los Programas de Detección Precoz de la Hipoacusia Neonatal se han venido implementando tanto en países de la Unión Europea como en Estados Unidos desde hace más de diez años. En nuestro país, con experiencias aisladas en cribado de niños con factores de riesgo para la sordera, fue Navarra la primera Comunidad Autónoma que puso en marcha un Programa Universal de Detección Precoz de la Hipoacusia Neonatal (PDPHN) en 1999. En estos momentos está totalmente consolidado.

La incidencia de todo tipo de sordera neonatal se cifra aproximadamente en un 5 por mil de recién nacidos. Para su detección la técnica que utilizamos son las otoemisiones acústicas de estímulo transitorio,

seguidas de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral, como prueba de diagnóstico definitivo. Conforme avanza el conocimiento técnico-científico, se va logrando mejorar la calidad en las técnicas utilizadas. En este trabajo queremos evaluar el resultado de la utilización de las otoemisiones acústicas automáticas (ECHOCHECK, Otodynamics Ltd) como test de screening en un programa poblacional de detección precoz de la hipoacusia neonatal, comparándolo con la técnica que venimos utilizando hasta ahora (ILO 288, Otodynamics Ltd). Como hipótesis de partida pensamos que desde el punto de vista de la detección al menos será tan bueno como el utilizado hasta ahora), presentando en otros aspectos (duración de la prueba, facilidad de manejo, menor necesidad de cualificación del personal, portabilidad, etc.), mejoras importantes en la eficiencia del programa en general.

Objetivo Global del proyecto

Valorar la idoneidad de la técnica de las otoemisiones automáticas (ECHOCHECK) como técnica de scree-

ning en el programa de detección precoz de hipoacusia neonatal de Navarra.

Objetivos secundarios

1. Evaluar los indicadores de proceso (porcentajes de paso o no paso en las distintas fases del cribado y compararlos con los obtenidos con la técnica habitual utilizada, ILO 288).
2. Evaluar los indicadores de resultado (tasa de detección de hipoacusia) y compararlos con los obtenidos con la técnica habitual utilizada, ILO 288).
3. Evaluar los tiempos y recursos necesarios para la realización de las pruebas y para el procesamiento de los datos, con el fin de descubrir si se produce una mejora en el proceso asistencial.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Ámbito y sujetos de estudio. Población objetivo: todos los recién nacidos de Navarra.
- Población de muestreo. Muestra: todos los recién nacidos durante un año en el Hospital Virgen del Camino de Pamplona.
- Diseño del estudio: prospectivo descriptivo transversal con datos apareados.
- Intervenciones: realización de las dos técnicas a comparar a todos los niños participantes en el estudio.
- Variables estudiadas: identificativas del niño y de la madre, antecedentes de riesgo para la hipoacusia, relativas a la prueba de screening y a la confirmación diagnóstica.
- Medidas de estudio: porcentaje de paso de cada fase del programa, a la prueba de diagnóstico, tendencias, concordancia, valores predictivos; tasa de detección y tipos de hipoacusias detectadas.

RESULTADOS

- Durante el tiempo de estudio, se ha realizado screening auditivo mediante dos técnicas (ILO y ECHOCHECK) a 4.504 niños nacidos en el Hospital Virgen del Camino de Pamplona.
- Los porcentajes de "paso" de ECHOCHECK han resultado ser significativamente más altos que los de ILO, tanto para la primera otoemisión (95,16% vs 93,69%; $p=0,0024$), como para la segunda (82,7% vs 72,6%; $p=0,0035$) y tercera (53,62% vs 28,99%; $p=0,0024$).
- La tasa de remisión a diagnóstico definitivo es considerablemente menor con la técnica de ECHO (0,71%) que con la de ILO (1,08%). Vemos por tanto, que se produce una disminución de falsos positivos casi del 35% cuando utilizamos únicamente la técnica ECHO.

- Se hubieran evitado 111 pruebas por parte del ECHO de (66 segundas otoemisiones, 28 terceras otoemisiones y 17 potenciales evocados auditivos).
- No ha sido posible cuantificar el posible ahorro de tiempo, aunque sí se ha comprobado que el tiempo exigido para la realización de la prueba es menor.
- La concordancia encontrada entre las dos técnicas para la primera otoemisión ha sido muy buena ($kappa=0,82$), para la segunda otoemisión buena ($kappa=0,68$), y para la tercera moderada ($kappa=0,52$). Estos resultados son acordes a la realidad de que una de las pruebas (ECHO) realmente produce muchos menos falsos positivos que la otra (ILO).
- El VPP en todo momento ha sido superior en el caso del ECHO, aunque sin alcanzar significación estadística. También se ha visto que este VPP ha ido aumentando en las sucesivas fases del cribado: se observa, como es de esperar, que conforme se avanza en el proceso de screening y la población está cada vez más seleccionada, estos VPP van aumentando su valor.
- Se registró un caso de falso negativo por parte del ECHO, lo que nos hace insistir en la importancia del seguimiento por parte de los pediatras de los niños, especialmente con factores de riesgo, a través del programa del niño sano.
- En este grupo de niños se detectaron 15 hipoacusias, lo que corresponde a una tasa de 3,33 por mil recién nacidos (4 por mil si se considera también los niños que fueron evaluados solo con una técnica). A destacar que una de ellas no se hubiera detectado si solo se hubiera realizado el ECHO.
- A la vista de lo anteriormente expuesto, consideramos que Echocheck es una técnica adecuada como test de screening para el Programa de Detección Precoz de la Hipoacusia Neonatal de Navarra.

DISCUSIÓN

A la vista de los resultados que hemos obtenido en este estudio, que son acordes a la evidencia hallada en la literatura científica revisada, pensamos que la realización de otoemisiones automáticas (Echocheck R), como test de screening de la hipoacusia neonatal, es una técnica que presenta ventajas sobre otros tipos de otoemisiones. Estas ventajas avalarían la decisión de adoptar el Echocheck como test de screening para el Programa de Detección Precoz de la Hipoacusia Neonatal de Navarra.

Sin embargo, la posibilidad de aparición de falsos negativos y el conocimiento de que de todas las hipoacusias que afectan a los niños, de un 20 a un 30%, se desarrollan posteriormente al nacimiento, nos hace pensar que el seguimiento de los niños mediante el programa del niño sano es fundamental para poder detectar a la menor brevedad posible la aparición de una hipoacusia más tardía.

Implicación de la ghrelina en el desarrollo de hipertensión asociada a la obesidad

A. Rodríguez^{1,4}, N. Sáinz^{1,4}, S. Becerril^{1,4}, C. Silva^{2,4}, I. Colina³, J. Gómez-Ambrosi^{1,4}, J. Salvador^{2,4}, G. Frühbeck^{1,2,4}

1. Laboratorio de Investigación Metabólica. Universidad de Navarra.
2. Departamento de Endocrinología. Clínica Universidad de Navarra.
3. Departamento de Medicina Interna. Clínica Universidad de Navarra.
4. CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.

FUNDAMENTOS DEL PROYECTO

La obesidad y la hipertensión constituyen los principales determinantes en el desarrollo de la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI), uno de los principales factores de riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular. Algunos factores neuroendocrinos, como la hormona del crecimiento (GH), determinan la masa cardíaca y contribuyen al desarrollo de la HVI. La ghrelina es una hormona orexigénica producida por el estómago, que favorece la liberación de GH en el hipotálamo mediante la activación del receptor de secretagogos de GH (GHS-R). Las principales isoformas de la ghrelina son la ghrelina acilada, ~5% de la ghrelina total circulante, que posee una modificación *n*-octanoil en el residuo de serina 3, y la desacil-ghrelina, ~95% de la hormona total circulante sin esta acilación. La ghrelina participa en la homeostasis cardiovascular. La administración intravenosa de ghrelina en individuos sanos, así como en pacientes con fallo cardíaco crónico, disminuye la presión arterial y mejora la función cardíaca.

Los niveles de ghrelina total disminuyen en la obesidad, la resistencia insulínica, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico, así como en la hipertensión esencial, hipertensión inducida por el embarazo y fallo cardíaco crónico. El objetivo de este estudio consistió en discernir la relación entre las principales isoformas de ghrelina, la hipertensión asociada a la obesidad y la HVI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos del estudio

El estudio se realizó en 180 voluntarios caucásicos (66 delgados y 114 obesos) que acudieron a los departamentos de Medicina Interna y Endocrinología de la Clínica Universitaria de Navarra. Los sujetos se clasificaron de acuerdo a su índice de masa corporal (IMC) en delgados (<25,0 kg/m²) u obesos (≥30,0 kg/m²). La población hipertensa se definió como pacientes con presión arterial diastólica y/o sistólica ≥140 mm Hg y ≥90 mm Hg, respectivamente. Los pacientes siguieron un examen clínico, incluyendo historia médica, exploración física, evaluación de comorbilidades y extracción sanguínea. El diseño experimental fue aprobado desde un punto de vista ético y científico por el Comité Ético de Investigación de la clínica y los voluntarios dieron su consentimiento informado para participar en el estudio.

Determinación de ghrelina acilada y desacil-ghrelina

Las muestras de sangre se obtuvieron en ayunas por la mañana para evitar posibles sesgos debidos al ritmo circadiano hormonal. La ghrelina acilada y la desacil-ghrelina plasmáticas se determinaron mediante ELISA (LINCO Research, St. Charles, MO, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, siendo los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo 5,5% y 2,6%, respectivamente, para la ghrelina acilada, y 4,7% y 4,2%, para la desacil-ghrelina.

Estudio de la función y masa cardíaca

Las ecocardiografías bidimensionales, de tipo M y Doppler se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de la *American Society of Echocardiography*. La masa del ventrículo izquierdo (LVM) se calculó conforme a la fórmula descrita por Devereux et al. Los índices de LVM (LVMI) se calcularon mediante la división de LVM por el área de superficie corporal. La presencia de HVI se diagnosticó según los criterios descritos en el *Framingham Heart Study*: LVMI ≥131 g/m² para varones y 102 g/m² para mujeres.

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron mediante un ANOVA de 2 criterios. En caso de interacción, se aplicó un ANOVA de 1 criterio seguido de un test de Scheffé.

RESULTADOS

Los pacientes con hipertensión asociada a la obesidad presentaron mayor índice de masa corporal, así como valores superiores de glucemia, insulinemia e índice HOMA en ayunas, que los obesos normotensos. Los individuos obesos presentaron mayores concentraciones de ghrelina acilada y menores concentraciones de ghrelina desacilada que sus controles delgados. La presencia de hipertensión modificó las concentraciones circulantes de ghrelina acilada, pero no los niveles de desacil-ghrelina. Tras ajustar para las variables de género, edad e IMC tan sólo se encontró correlación de la ghrelina acilada con la presión arterial sistólica ($r=0,22$, $P<0,01$).

Para analizar la relación o influencia de la LVM sobre las concentraciones circulantes de las isoformas de

ghrelina, se determinaron variables ecocardiográficas en individuos obesos en ausencia (n=39) o presencia (n=12) de HVI. Las concentraciones plasmáticas de ghrelina acilada fueron superiores en individuos obesos con HVI que en sujetos obesos con LVM apropiada. No se observaron cambios en la desacil-ghrelina. Los niveles circulantes de ghrelina se correlacionaron positivamente con la LVM ($r=0,44$; $P<0,05$) y LVMI ($r=0,34$; $P<0,01$), incluso después de corregir por el IMC.

DISCUSIÓN

La ghrelina participa en la homeostasis cardiovascular. La administración de ghrelina en individuos sanos o en pacientes con fallo cardiaco crónico disminuye la presión arterial, sin ejercer cambios sobre la frecuencia cardiaca. Diversos estudios han asociado el incremento en las concentraciones plasmáticas de ghrelina con la hipertensión en mujeres obesas, o en mujeres embarazadas con preeclampsia comparadas con mujeres embarazadas sanas. El aumento de la ghrelina acilada observado en la hipertensión asociada a la obesidad podría constituir un mecanismo hipotensor compensatorio.

En el presente estudio se ha demostrado que los pacientes obesos con HVI presentan concentraciones circulantes de ghrelina acilada que los individuos obesos con LVM apropiada, confirmando el papel cardioprotector de esta hormona. La asociación positiva de la ghrelina acilada con la LVM y el LVMI sugiere cambios en la anatomía y función del VI en la HVI asociada a la obesidad. Diversos estudios experimentales y clínicos sostienen esta hipótesis. La administración aguda de ghrelina en pacientes con fallo cardiaco crónico mejora la función cardiaca aumentando el gasto cardiaco y el volumen de sangre bombeado por latido. Asimismo, la administración crónica de ghrelina mejora la disfunción del VI y disminuye el remodelado del VI y la caquexia en ratas con fallo cardiaco crónico.

El aumento de las concentraciones circulantes de ghrelina acilada podría constituir un mecanismo compensatorio para evitar el desarrollo de hipertensión y HVI asociados a la obesidad. Estos hallazgos podrían tener relevancia clínica para identificar aquellos pacientes obesos, con LVM inapropiada y disfunción diastólica asintomática propensos a desarrollar HVI y otras complicaciones cardiovasculares.

Las concentraciones plasmáticas de osteopontina y la expresión en el tejido adiposo están aumentadas en la obesidad

J. Gómez-Ambrosi^{1,2}, V. Catalán^{1,2}, B. Ramírez^{1,2}, A. Rodríguez^{1,2}, I. Colina³, C. Silva^{2,4}, F. Rotella^{2,5}, C. Mugueta⁶, M. J. Gil^{2,6}, I. Monreal⁶, J.A. Cienfuegos^{2,5}, J. Salvador^{2,4}, G. Frühbeck^{1,2,4}

1. Laboratorio de Investigación Metabólica. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona.
2. CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN). Instituto de Salud Carlos III.
3. Departamento de Medicina Interna. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona.
4. Departamento de Endocrinología. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona.
5. Departamento de Cirugía. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona.
6. Departamento de Bioquímica. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona.

FUNDAMENTO

Los cambios en el estilo de vida y alimentación han llevado a lo largo de las últimas décadas a un aumento progresivo de la incidencia de la obesidad, constituyendo una de las alteraciones metabólicas más frecuentes en el mundo occidental. La información disponible indica que asistimos a una verdadera pandemia. Estudios recientes ponen de manifiesto que el 53,5% de la población española padece exceso de peso, situándose la prevalencia de obesidad en España en el 14,5%. La obesidad es considerada un grave problema de salud pública, ya que como es bien sabido, se asocia a una elevada morbilidad y mortalidad por patologías tales como diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, hipertensión arterial, hiperlipidemias, etc.

La osteopontina (OPN) es una proteína multifuncional de 314 aminoácidos. Se expresa abundantemente en el hueso, aunque también se detecta en cantidades

notables en otros tipos celulares como macrófagos, células endoteliales, células de músculo liso y células epiteliales. La OPN se encuentra altamente conservada entre especies, lo cual da idea de su importancia fisiológica. Está sujeta a regulación post-traduccional, siendo fosforilada y glicosilada. La OPN se une a receptores integrina y a isoformas de CD44. Aunque el control de la expresión de OPN no está completamente entendido, es bien conocido que está sujeta a regulación por citoquinas proinflamatorias. La OPN está implicada, además de en el metabolismo óseo, en procesos tumorales, en la respuesta inmune e inflamatoria, en la reproducción, en enfermedades renales y respiratorias y en procesos ateroscleróticos y cardiovasculares, así como en el desarrollo de diabetes y de hígado graso no alcohólico.

En la etiopatología de la obesidad, desempeña un papel fundamental el metabolismo del tejido adiposo, que además de constituir el principal almacén de energía en forma de grasa es el principal o único sitio de produc-

ción de numerosas señales reguladoras del balance energético. En este sentido, se ha demostrado que el tejido adiposo expresa una gran variedad de genes, implicados en multitud de procesos fisiológicos. Trabajos recientes demuestran que las células presentes en el tejido adiposo son capaces de expresar OPN. Por otra parte, la expresión de OPN en hepatocitos en cultivo se encuentra regulada por la leptina, hormona producida por el tejido adiposo y muy implicada en la regulación del apetito y el gasto energético. Asimismo, la expresión de OPN resulta reprimida por la acción de los agonistas PPAR γ , que son agentes insulino-sensibilizantes. Su expresión en el tejido adiposo, junto con su implicación en la diabetes mellitus, en las enfermedades cardiovasculares y en el desarrollo de hígado graso no alcohólico lleva a pensar que la OPN podría estar involucrada en la obesidad y sus comorbilidades asociadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron 77 sujetos (26 con normopeso, 14 con sobrepeso y 37 obesos), de ambos sexos, que acudieron al Departamento de Endocrinología y Nutrición de la Clínica Universitaria de Navarra. Por otra parte, con el objeto de analizar el efecto de la pérdida de peso,

se analizó el efecto de un tratamiento dietético convencional en 12 varones. Se midieron los datos antropométricos determinando la composición corporal mediante pletismografía por desplazamiento de aire (Bod-Pod® Body Composition System). Se midieron variables bioquímicas como glucosa, insulina, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos y marcadores de riesgo cardiovascular: adiponectina, leptina, TNF- α , C-reactiva, etc. Se midieron las concentraciones circulantes de OPN mediante ELISA comercial (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) con coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de 3,2% y 5,9%, respectivamente.

RESULTADOS

Las características clínicas de los pacientes se presentan en la tabla 1. Como era de esperar, el porcentaje de grasa corporal fue significativamente mayor ($P < 0,0001$) en los individuos con sobrepeso y obesos, quienes, a su vez, exhibieron una menor sensibilidad a la insulina que los individuos con normopeso, evidenciada por el menor valor del índice QUICKI ($P < 0,0001$). Los marcadores proinflamatorios PCR y TNF- α estaban aumentados en los individuos con sobrepeso y obesidad ($P < 0,0001$).

Tabla 1. Características de los pacientes.

	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad	P
n	26	14	37	
Sexo, V/F	11/15	7/7	19/18	0,769
Edad, años	32,8 \pm 10,8	37,1 \pm 14,1	40,8 \pm 10,8*	0,028
IMC, kg/m ²	20,4 \pm 2,3	26,8 \pm 1,6*	41,0 \pm 5,4*†	<0,0001
Grasa corporal, %	19,3 \pm 5,8	35,4 \pm 6,6*	46,3 \pm 7,1*†	<0,0001
PAS, mm Hg	106 \pm 13	106 \pm 11	129 \pm 16*†	<0,0001
PAD, mm Hg	68 \pm 9	66 \pm 6	81 \pm 11*†	<0,0001
Glucosa, mmol/l	4,6 \pm 0,6	5,2 \pm 0,6	5,8 \pm 1,8*	0,003
Insulina, μ U/ml	5,8 \pm 3,1	10,3 \pm 4,0	19,2 \pm 11,5*†	<0,0001
QUICKI	0,385 \pm 0,038	0,340 \pm 0,021*	0,314 \pm 0,029*†	<0,0001
Triglicéridos, mmol/l	0,7 \pm 0,3	1,3 \pm 0,9	1,9 \pm 2,2*	0,019
Colesterol, mmol/l	4,2 \pm 0,9	5,4 \pm 1,2*	5,3 \pm 1,3*	<0,001
HDL-colesterol, mmol/l	1,6 \pm 0,3	1,4 \pm 0,4*	1,1 \pm 0,2*†	<0,0001
PCR, mg/l	0,7 (0,4-1,0)	3,5 (0,4-5,9)*	7,4 (2,4-11,8)*†	<0,0001
TNF- α , pg/ml	1,51 \pm 0,42	2,12 \pm 0,92*	2,16 \pm 1,10*	0,021
ALT, UI/l	8 \pm 6	19 \pm 24*	31 \pm 19*†	<0,0001
Adiponectina, μ g/ml	13,8 \pm 7,0	9,1 \pm 4,8*	8,9 \pm 4,0*	0,002
Leptina, ng/ml	6,5 (4,3-9,6)	22,0 (9,4-29,7)*	47,3 (31,2-73,2)*†	<0,0001

ALT, alanino aminotransferasa; IMC, índice de masa corporal; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; PCR, proteína C-reactiva; QUICKI, *quantitative insulin sensitivity check index*; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α . Los valores representan la media \pm DS o mediana (rango intercuartílico). Las diferencias entre grupos se determinaron mediante ANOVA seguido de tests LSD de Fisher. * $P < 0,05$ vs normopeso. † $P < 0,05$ vs sobrepeso. Las diferencias entre sexos se analizaron mediante el análisis de χ^2 . Los valores de PCR y leptina se transformaron logarítmicamente.

Las concentraciones circulantes de OPN se encontraron significativamente aumentadas en los pacientes con obesidad y sobrepeso (obesidad $72,6 \pm 28,5$, sobrepeso $68,2 \pm 20,8$, normopeso $42,7 \pm 27,9$ ng/ml; $P < 0,001$) en comparación con los individuos con normopeso (Fig. 1). No se encontraron diferencias significativas ($P = 0,671$) entre varones ($60,2 \pm 30,8$ ng/ml) y mujeres ($63,1 \pm 29,7$ ng/ml). Los valores circulantes de OPN se correlacionaron positivamente con el porcentaje de grasa corporal ($r = 0,45$, $P < 0,0001$).

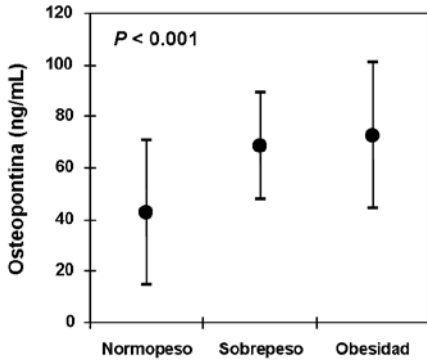


Figura 1. Niveles circulantes de osteopontina

Se detectó la presencia de la proteína OPN en tejido adiposo omental de un paciente obeso mediante análisis inmunohistoquímico. Tanto los adipocitos como las células de la fracción estromavascular fueron inmunopositivas para OPN. Como era de esperar, marcaje para CD68, un marcador específico para macrófagos, se detectó únicamente en los macrófagos infiltrados en el tejido adiposo. El marcaje de OPN fue más intenso en células CD68 positivas, pero también se detectó un fuerte marcaje en adipocitos maduros. La expresión de ARNm de OPN en tejido adiposo omental fue significativamente mayor en los pacientes obesos en comparación con los individuos con normopeso (obesidad $2,44 \pm 0,88$ vs normopeso $1,00 \pm 0,52$ unidades arbitrarias; $P < 0,05$). Por último, la pérdida de peso por tratamiento dietético convencional produjo una disminución estadísticamente significativa de los niveles circulantes de OPN pasando de $64,7 \pm 22,1$ a $36,6 \pm 20,1$ ng/ml ($P < 0,01$).

En resumen, podemos concluir que las concentraciones plasmáticas de OPN están aumentadas en la obesidad en humanos. Además, la OPN es detectable en el tejido adiposo omental y su expresión está aumentada en la obesidad. Finalmente, los niveles circulantes de OPN disminuyen significativamente tras la pérdida de peso por tratamiento dietético convencional.

