

Desarrollo y análisis de ensayos de citogenética molecular (FISH) en pacientes con mieloma múltiple y gammapatía monoclonal de significado incierto: aplicaciones en el diagnóstico y pronóstico, y correlación con datos clínicos

M.J. Calasanz

Departamento de Genética. Universidad de Navarra. Pamplona

FUNDAMENTO

El mieloma múltiple (MM) y la gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) pertenecen al grupo de enfermedades denominadas discrasias de células plasmáticas (PCD). Desde el punto de vista genético, las PCD se caracterizan por una gran heterogeneidad en cuanto a las alteraciones genéticas que presentan. Como consecuencia de esta gran inestabilidad genómica, se ha producido un retraso del conocimiento de los patrones de alteraciones cromosómicas en las PCD en contraste con otras neoplasias hematológicas, genéticamente mejor caracterizadas.

La utilización de las técnicas de derivadas de la hibridación *in situ* con fluorescencia en MM y MGUS permitirá un mayor conocimiento de las alteraciones genéticas y de su implicación biológica en el proceso tumoral.

Los objetivos del presente trabajo son:

- Análisis de la incidencia real de alteraciones cromosómicas en MM y MGUS con cariotipo no informativo mediante I-FISH. Análisis de los genes: IGH, IGL, IGK, TP53, REL, 13q14.
- Desarrollo de ensayos de FISH y FICTION multicolor para la detección de los reordenamientos de los genes de las IG más frecuentes en MM. Diseño de sondas para la detección de las translocaciones: t(1;14)(q21;q32), t(4;14)(p16;q32), t(6;14)(p21;q32), t(6;14)(p25;q32), t(11;14)(q13;q32), t(14;16)(q32;q23), t(14;20)(q32;q12). Comprobación de su validez diagnóstica.
- Detección de nuevas alteraciones recurrentes en MM con cariotipos complejos mediante SKY-FISH.
- Delineación de los patrones de alteraciones cromosómicas en MM mediante técnicas de estadística multivariante.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 9 líneas celulares derivadas de PCD, RPMI-8226, SK-MM-2, U-266, OPM-2, L-363, JIN3, LP-1, KARPAS-620, NCI-H929 y 70 pacientes de MM y 50 de MGUS al diagnóstico. Kits para la extracción y marcaje de ácidos nucleicos. Sondas FISH comerciales o previamente descritas. Herramientas bioinformáticas apropiadas y software para el análisis de imagen y paquetes estadísticos para el estudio multivariante.

Los métodos empleados fueron:

- FISH comercial y diseño de nuevas sondas. Extracción y marcaje de DNA e hibridación en casos de MM según protocolos de Schlegel-berger y col (1999).
- FISH y FICTION multicolor según Weber-Mattiesen y col (1992) y Martín-Subero y col (2002).
- SKY-FISH según protocolo (Schrock E y col, 1996).
- Análisis multivariante mediante *Average Linkage Hierarchical Clustering* (coeficientes de Jaccard, Dice y Sokal).

RESULTADOS

a) Se diseñaron sondas de I-FISH para la detección de deleciones 13q14 y del gen TP53, y se mejoró el diseño de la sonda comercial *LSI IGH break apart* (Vysis, IL, USA) mediante la adición de un nuevo clon en un tercer fluorocromo, lo que incrementa su sensibilidad. De los 50 mielomas estudiados, 18 (36%) casos presentaron alguna alteración cromosómica en al menos uno de los loci estudiados. Las alteraciones más frecuentes fueron las translocaciones de IGH, en un 20% (10/50) de los casos, las alteraciones en 13q14, presentes en el 12% de los casos estudiados (6/50), las translocaciones de IGL, con una incidencia del 10% (5/50) y deleciones del gen TP53 o alteraciones en 17p en el 8% de los casos (4/50). Únicamente 4 de los 50 (8%) casos de MGUS fueron positivos para alguna de las alteraciones estudiadas.

b) Se diseñaron dos ensayos de FISH multicolor. El primero de ellos para la detección de las translocaciones t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32), t(14;16)(q32;q23) y la t(6;14)(p21;q32) que desregulan respectivamente los oncogenes CCND1, FGFR3/MMSET, MAF, CCND3. El segundo permite detectar reordenamientos de los oncogenes IRF4, IRTA1/2 y MAFB, t(6;14)(p25;q32), t(14;20)(q32;q11) y la t(1;14)(q21;q32). Mediante la combinación de estos nuevos ensayos con marcadores inmunofenotípicos específicos de célula plasmática se desarrollaron ensayos de FICTION multicolor. La validez de los ensayos se comprobó en 9 líneas celulares, detectando la translocación en 8 de ellas, y posteriormente en una serie de 12 MM con puntos de rotura en IGH. Cuatro de los 12 casos (33%) presentaron una t(11;14)(q13;q32), 2 casos (16%) pre-

sentaron una t (4;14) (p16; q32) y los dos casos restantes presentaron una t (6;14) (p25; q32) y una t (14;20) (q32; q11) respectivamente.

c) Se analizaron 12 MM con cariotipo complejo mediante SKY-FISH. Las recurrencias encontradas afectan a: locus IGH en 14q32, t (11;14) (q13; q32) (3 casos), t (14;20) (q32; q13.1) (1 caso) y t (6;14) (q?; q32) (1 caso). El análisis mediante FISH detectó la implicación del oncogen MAFB en 20q13 en el caso con la t (14;20) (q32; q13.1). Locus IGL en 22q11.2: ocho casos presentaron reordenamientos en 22q11.2. Se encontraron dos translocaciones recurrentes en este grupo. Cuatro casos presentaron la translocación variante Burkitt-like t (8;22) (q24; q11.2). Puntos de rotura en 22q11.2: se detectó una translocación desequilibrada der (1) t (1;22) (p13; q11.2) en dos casos. Además, se detectaron dos nuevas translocaciones, t (10;22) (q?; q11.2) y t (11;22) (p11.2; q11.2). Nuevos puntos de rotura recurrentes: el punto de rotura más frecuente fue 1p13 (9/12 casos). Dos casos fueron deleciones, dos casos correspondieron a la translocación recurrente t (1;22), y los restantes casos presentaron reordenamientos no recurrentes. Se encontraron puntos de rotura en 13q14-q21, Xp11.2 y Xq21.

d) El estudio multivariante de los MM con cariotipo complejo reveló la existencia de dos grupos con fre-

cuentes alteraciones en 14q32 con y sin hipodiploidía marcada, y un tercer grupo hiperdiploide.

DISCUSIÓN

El diseño de nuevas sondas para la detección de deleciones 13q14 y del gen TP53, así como el desarrollo de los nuevos ensayos de FISH y FICTION multicolor aportan una herramienta robusta para el diagnóstico y la investigación citogenética en las PCD, y contribuyen al mayor conocimiento de la base genética de estas patologías. El análisis de los MM con cariotipo complejo mediante SKY-FISH permite la detección de nuevas alteraciones recurrentes, con posible implicación en la biología del tumor. La delineación de patrones cariotípicos mediante estadística multivariante permite un mejor y más profundo estudio citogenético de la variabilidad y complejidad de la neoplasias hematológicas. En conclusión, el presente estudio ha permitido un mayor conocimiento de las alteraciones genéticas en PCD (MM y MGUS) y de su implicación biológica en el proceso tumoral, lo que en última instancia repercutirá en un beneficio para el paciente, tanto por el desarrollo de nuevas y más precisas técnicas diagnósticas como por la optimización de nuevas estrategias terapéuticas adaptadas a mecanismos patogénicos específicos.

Genotipo y variantes genéticas en la región promotora del gen de apo E en el ictus aterotrombótico

I. Jericó

Servicio de Neurología. Hospital Virgen del Camino. Pamplona.

FUNDAMENTO

La enfermedad cerebrovascular es la principal causa de muerte en mujeres en nuestro país y la segunda en hombres, además de ser una de las principales causas de discapacidad en nuestro medio. Desde el punto de vista etiológico es muy heterogénea, siendo un 25%, aproximadamente, de los infartos cerebrales isquémicos secundario a la enfermedad aterosclerosa que afecta a arterias supraaórticas (extra e intracraneales).

Los factores de riesgo clásicos (HTA, diabetes mellitus, dislipemia, tabaquismo, etc.) no explican todos los casos de enfermedad aterosclerosa sintomática. Los factores genéticos están cobrando cada vez más importancia y están siendo mejor conocidos gracias a los avances en el campo de la biología molecular.

Uno de los genes candidatos más estudiados en este campo es el gen de la apolipoproteína E. Esta apolipoproteína juega un papel importante en el metabolismo, transporte y reciclaje de lípidos, estando asociada la presencia de la isoforma E4 a hipercolesterolemia y a enfermedad coronaria inde-

pendientemente de los niveles de colesterol. La asociación del genotipo de apo E con la patología cerebrovascular es controvertida.

Al nivel de la placa de ateroma en la pared arterial, los macrófagos juegan un papel fundamental en el acúmulo lipídico internalizando colesterol (LDL oxidada) a través de los receptores "scavengers" o basureros y favoreciendo el transporte reverso de colesterol gracias a la síntesis y expresión de apo E.

La modulación de la expresión de apo E por parte del macrófago es compleja y está influenciada entre otros factores por los polimorfismos en la región promotora del gen de apo E.; Lambert y col en el estudio ECTIM (años 2000), demostraron que la presencia del alelo -219T en el promotor del gen de apo E está asociada a un mayor riesgo de padecer un infarto de miocardio.

En nuestro estudio hemos intentado conocer si el genotipo de apo E, los polimorfismos en la región promotora del gen de apo E -219G/T y -491A/T deben ser considerados como nuevos factores de riesgo para el infarto cerebral aterotrombótico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron muestras sanguíneas previo consentimiento informado a 150 pacientes consecutivos con diagnóstico de infarto cerebral aterotrombótico y edad <70 años. Como controles: 104 recién nacidos sanos consecutivos (control 1); 114 sujetos >65 años (65-89) sin patología vascular sintomática voluntarios (control 2); 148 sujetos de igual edad a la muestra, normolipémicos, sin patología vascular sintomática, voluntarios (control 3)

El DNA genómico se ha extraído de las células nucleadas de las muestras sanguíneas, amplificando por PCR las secuencia a estudio que han sido digeridas posteriormente por los enzimas de restricción correspondientes: Hha I para el genotipo de apoE; Dra I para el polimorfismo promotor -491A/T y Taq I para el polimorfismo promotor -219G/T.

Los fragmentos obtenidos se han analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%.

RESULTADOS

En nuestro estudio hemos observado que el alelo E4 era más frecuente en el grupo de pacientes con ictus que en controles (0,10 frente a 0,07, respectivamente) aunque las diferencias encontradas no eran estadísticamente significativas. Al dividir el grupo de pacientes con ictus en diferentes subgrupos según edad, hemos observado que la presencia de E4 es significativamente mayor en sujetos más jóvenes frente a controles (0,23 en <50 años, 0,10 en el total de ictus y 0,07 en con-

troles; $p=0,014$ (OR IC 95% 3,7 (1,34-11,71) y $p=0,172$ (ns) (OR IC 95% 1,44 (0,89-2,71) respectivamente.

Ni la prevalencia de los genotipos GG, GT y TT ni la frecuencia alélica T y G del polimorfismo -219G/T del promotor del gen de apo E diferían entre casos y controles.

Al analizar el polimorfismo -491 A/T, hemos observado una mayor frecuencia estadísticamente significativa del genotipo TT y del alelo T en los casos frente a los controles (frec. alélica del alelo T 0,23 en casos frente 0,18 controles; $p=0,046$).

CONCLUSIONES

- 1) La frecuencia alélica de E4 en nuestra población control es del 7,5%, similar a la frecuencia de otras poblaciones del sur de Europa (<10%).
- 2) El alelo E4 es más frecuente entre los pacientes con ictus aterotrombótico que en los controles, lo que muestra una asociación entre la presencia del alelo E4 y la patología cerebrovascular aterotrombótica.
- 3) El alelo E4 es un factor de riesgo para el ictus aterotrombótico, especialmente en sujetos menores de 55 años.
- 4) El alelo T en la posición -491 de la región promotora del gen de apo E es un factor de riesgo genético que aumenta la susceptibilidad para padecer un ictus aterotrombótico.

Reanimación cardiopulmonar utilizando balón de oclusión intraaórtico: análisis de supervivencia y secuelas en modelo animal en cerdos

J. Sesma, J. L. Espila, A. Lozano, M. J. Sara, D. Guerrero, M. J. Saez Martínez, S. Calavia
Servicio de Urgencias. Hospital Virgen del Camino. Pamplona.

FUNDAMENTOS

Durante la reanimación cardiopulmonar (RCP) estándar con compresiones torácicas externas se ha constatado que la presión arterial al nivel de arterias coronarias y cerebrales es baja. Esto ha dado pie a investigaciones en las cuales se pretende aumentar el flujo sanguíneo en dichas áreas.

Los balones de oclusión aórtica se están utilizando en estudios experimentales de estos últimos años, para poder lograr una perfusión sanguínea selectiva. En estudios de animales se ha observado que mediante estas terapias adyuvantes se incrementan las presiones de perfusión en los órganos vitales, el porcentaje de retorno a circulación espontánea e incluso la supervivencia.

La hipótesis planteada ha sido que la utilización durante la RCP del balón de oclusión intraaórtico:

incrementa el porcentaje de supervivencia, disminuye el daño cerebral y miocárdico y no incrementa de manera significativa el daño renal, hepático, medular e intestinal. Los niveles de lactato en plasma son menores en cerdos reanimados con balón

Los objetivos del presente trabajo han sido la comparación de porcentajes de supervivencia y los diferentes tipos de secuelas entre sujetos reanimados con y sin balón de oclusión intraaórtico y el estudio de la correlación entre el ácido láctico con índice de supervivencia tanto en sujetos reanimados con balón como sin balón.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño. Estudio experimental.

Sujetos a estudio:

NOTAS INFORMATIVAS

Grupo 1. Cerdos domésticos de 25 ± 2 kg, de 10-12 semanas de edad, anestesiados, analgésicos, ventilados mecánicamente y relajados con ketamina, propofol, fentanest®, y nimbex®. Se colocan dos catéteres en aorta torácica descendente a nivel del diafragma tanto para medir presiones como para hacer un cierre con un catéter con balón de oclusión. Inducción parada en FV: descarga eléctrica de corriente alterna: 70 voltios y 0,3 amperios. RCP: compresiones torácicas con compresor hidráulico (frecuencia de 80 por minuto), con una presión de 80 psi, consiguiendo descenso de tórax entre 3 y 5 cm. Resucitación: choque con desfibrilador a los 8 minutos del inicio de la parada (100-200 julios).

Grupo 2. Igual pero sin aplicar el balón aórtico.

Grupo 3. Controles sin que se les aplique RCP, para medición de ácidos lácticos.

Recogida de datos y metodología siguiendo "estilo Utstein" para animales de experimentación. Supervi-

vencia: recuperación complejo eléctrico organizado, pulso espontáneo y lectura de ETCO₂, medido hasta 72 horas. Eutanasia: sobredosis cloruro potásico. Análisis de secuelas:

A. Laboratorio: medición de nivel de apoptosis celular en tejidos cerebral y medular. Técnicas: TUNEL, anticuerpo monoclonal Mab F7-26 y técnica de caspasa 3.

B. Clínico: valoración del estado neurológico a las 72 horas de supervivencia.

Análisis estadístico: se han utilizado los programas estadísticos SPSS y Epiinfo.

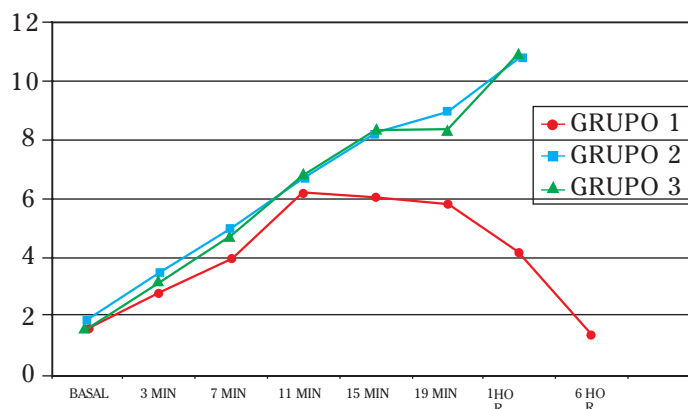
RESULTADOS

En la tabla 1 se expresan los porcentajes de supervivencia y en la figura 1 las curvas de los lactatos de los 3 grupos de estudio.

Tabla 1. Análisis de supervivencia.

Resumen	N	Sobreviven	Mueren
Grupo 1 Balón	9	8 (88,8%)	1
Grupo 2 Sin balón	9	1 (11,1%)	8
Grupo 3 Control Lactatos	14		

Chi cuadrado $p < 0,001$



T-test: $p < 0,01$ (correspondiente a minuto 7): grupos 1 y 2.

Figura 1. Curvas de ácidos láctico por grupos.

Análisis de secuelas: no se ha podido establecer el grupo 2 (reanimados sin balón) por falta de sujetos debido a la supervivencia tan baja.

- A. Datos de laboratorio inmunohistoquímicos: se ha conseguido marcar células en apoptosis a nivel hipocampo, no así a nivel medular.
 - B. Valoración clínica a las 72 horas: sujetos alerta, con buena función cardiopulmonar, digestiva, renal, con tono en esfínteres conservados. Reseñar sólo una claudicación parcial con la deambulación al nivel de pezuñas traseras, posiblemente secundarias a la ligadura para la colocación de catéteres mediante arteriotomía.
2. Los niveles plasmáticos de ácido láctico en el grupo reanimado con balón de oclusión son significativamente menores que el grupo reanimado sin balón y del grupo control.
 3. No se han podido establecer niveles de secuelas por grupos ya que el grupo reanimado sin balón ha tenido una supervivencia muy baja.
 4. Las células de hipocampo son más sensibles a las alteraciones inducidas por la isquemia-reperusión, reflejada como mayor activación de los apoptosis
 5. Las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas no han demostrado utilidad como marcadores de apoptosis en médula.

CONCLUSIONES

1. El uso de balón de oclusión a nivel de aorta diafragmática mejora indiscutiblemente la supervivencia de los sujetos de experimentación sometidos a parada cardíaca normotérmica y no traumática (88% frente a 11%).
6. El análisis de las secuelas del grupo reanimado con balón se ha tenido que hacer con parámetros clínicos, siendo los resultados muy favorables pudiéndose afirmar la práctica recuperación sin secuelas por lesión medular.

Papel de las interleuquinas 1 β y 6, y de la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en el deterioro cognitivo de los pacientes deprimidos de larga evolución

S. Cervera-Enguix¹, J. Salvador², J. Schlatter¹, J. Ortuño¹, J.C. Galofré², A. Sánchez-Ibarrola³, J.L. Zubieta⁴, I. Escamilla¹

1. Departamento de Psiquiatría y Psicología Médica. Universidad de Navarra. Facultad de Medicina. Pamplona.
2. Departamento Endocrinología. Universidad de Navarra. Facultad de Medicina. Pamplona.
3. Departamento Inmunología. Universidad de Navarra. Facultad de Medicina. Pamplona.
4. Departamento Radiodiagnóstico. Universidad de Navarra. Facultad de Medicina. Pamplona.

FUNDAMENTO

La psicoimmunología estudia la relación entre el sistema nervioso central, el sistema endocrinológico y el sistema inmunitario. El objetivo principal de este estudio es realizar una valoración de los mecanismos fisiopatológicos que pueden estar relacionados con el deterioro cognitivo que acompaña a los cuadros de depresión. Para eso, comparamos diversos parámetros psicopatológicos, endocrinológicos, estructurales y endocrinos en un grupo de pacientes con depresión de larga evolución y otro de corta duración, frente a un grupo de controles sanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos. La muestra estaba constituida por 40 pacientes deprimidos según criterios CIE-10 (20 con más de 10 años de evolución, y otros 20 con menos de

2) y 20 controles sanos (todos entre 18 y 75 años). Excluimos a los que padecen enfermedades o reciben tratamientos que alteran la función inmunitaria y endocrina. En algunos casos se realizó un periodo de lavado de al menos 5 días.

Método. El primer día se realizó la exploración psicopatológica (AMDP, Escalas de Hamilton para la depresión y ansiedad, *State-Trait Anxiety Inventory*, Escala de endogeneidad de Newcastle, y la Escala de estrés percibido), y firmaron el consentimiento informado. De todos los sujetos se recogió un perfil de cortisol plasmático y urinario libre durante 48 horas. Antes de la primera noche recibieron un placebo, y antes de la segunda, una dosis de alprazolam equivalente a 0,02 mg/kg. La primera mañana, además del cortisol se valoró la glucemia, leptina e insulina, así como los niveles de IL-1 β e IL-6. En la resonancia se valoró el volumen cerebral total y varias regiones de inte-

rés (córtex frontal, el hipocampo y la amígdala). La estimación volumétrica se realizó mediante procedimientos automáticos validados y estandarizados, incluyendo la técnica *Voxel Based Morphometry* (VBM). La valoración cognitiva incluyó el *Minimal State Examination*, Índices de Lawton y Barthel, Test de aprendizaje y memoria (TAVEC), Test de Copia de Figura Compleja de Rey-Osterreith, Subtest de memoria de textos MAI, Test de Cancelación de Campanas, Test de dígitos y claves de números del WAIS III, *Trail Making Test* (A y B), Test de fluidez verbal (FAS), *Corner Performance Test* (CPT) y Raven.

El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 10.0. Para la comparación de las variables volumétricas y clínicas entre las dos muestras se aplicó análisis de la varianza (ANOVAS), y un análisis post-hoc para comparaciones intergrupos. Para estudiar la correlación entre las distintas varia-

bles se aplicó la correlación de Pearson o de Spearman según siguieron una distribución normal o no.

RESULTADOS

Entre enero de 2002 y marzo de 2005 se han recogido 27 pacientes con depresión (11 varones/16 mujeres) y 11 controles sanos (7 varones/4 mujeres). La media de edad en los casos fue de 34 años y 32 para los controles. El número de pacientes con depresión de menos de 2 años fue de 16, mientras que los mayores de 10 años de evolución fueron 11. Los resultados que vamos a exponer se refieren al 70% de la muestra final.

Curva de cortisol en plasma y orina

Dentro de los pacientes deprimidos se observó un subgrupo con mayor resistencia a la supresión, sin que podamos determinar aún las características propias de este subgrupo (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la supresión de cortisol plasmático con alprazolam.

	Inicial		Placebo		Alprazolam
	8:00 h	24:00 h	8:00 h	24:00 h	8:00 h
Deprimidos (n=24)	17,1±5,1	4,7±3,0	16,4±5,4	4,8±3,1	16,5±5,1
Controles (n=19)	23,1±7,8	6,4±3,2	21,9±6,7	6,6±4,0	18,9±7,7

mgr/dl expresados como media (\pm DE)

Batería de tests neuropsicológicos

Se encontraron diferencias significativas en todas las funciones cognitivas entre los tres grupos estudiados. En los análisis post-hoc, las mayores diferencias se vieron entre controles y casos de larga evolución.

El tiempo de evolución de la depresión se correlacionó con la alteración de la atención [TMT-A tiempo ($r = 0,61$; $p = 0,02$); WAIS-III claves ($r = -0,53$; $p = 0,04$)], de la memoria [Figura compleja de Rey diferida ($r = -0,70$; $p = 0,01$); TAVEC (varios ítems de la memoria inmediata y a corto plazo)], y de la fluencia verbal [Test de Barcelona: lista de animales ($r = -0,53$; $p = 0,04$) y palabras iniciadas con P ($r = -0,66$; $p = 0,01$)].

El grado de depresión, de ansiedad y de endogeneidad no estaba asociado con las alteraciones de las funciones cognitivas.

CONCLUSIONES

Estos primeros datos orientan a que los déficits cognitivos más significativos fueron en las tareas de

memoria y atención, y estaban más relacionados con el diagnóstico de depresión y el tiempo de evolución, que con la intensidad y el componente endógeno.

Los resultados preliminares referentes al eje endocrino orientan a que las alteraciones dependen fundamentalmente del hecho de presentar o no depresión.

Un aspecto práctico es la posibilidad de aplicar la prueba de supresión del cortisol con alprazolam en vez de con dexametasona. No todas las personas pueden tomar dexametasona, y el alprazolam se tolera mejor. La confirmación de una resistencia por parte del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal orientaría al carácter endógeno de la depresión, y el mantenimiento de esta hiperfunción pese a la mejoría clínica también parece orientar a una predisposición mayor a la recaída, y un peor pronóstico.

Otro aspecto práctico es conocer mejor a qué se debe este deterioro en la depresión. Esta información puede ser muy útil sobre todo en personas de edad avanzada. Será también interesante conocer qué tests son más específicos para los casos de depresión.

Adiponectina: un nuevo factor de riesgo cardiovascular relacionado con la obesidad. Posible papel determinante de la resistencia a la leptina

J. Gómez-Ambrosi¹, A. Rodríguez¹, P. Oroz¹, S. Becerril¹, J. Salvador², G. Frühbeck^{1,2}

1. Laboratorio de Investigación Metabólica. Clínica Universitaria de Navarra. Universidad de Navarra. Pamplona.
2. Departamento de Endocrinología. Clínica Universitaria de Navarra. Universidad de Navarra. Pamplona.

FUNDAMENTO

Los cambios en el estilo de vida y alimentación han conducido en las últimas décadas a un progresivo aumento de la incidencia de la obesidad, siendo una de las alteraciones metabólicas más frecuentes tanto en los países en vías de desarrollo como en los países desarrollados. Los pacientes obesos presentan un riesgo elevado de enfermedad cardiovascular (EC). Se ha demostrado que a medida que aumenta el índice de masa corporal (IMC) aumenta la mortalidad por EC. Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos por los cuales el exceso de grasa conduce al desarrollo de EC no han sido totalmente esclarecidos.

La adiponectina es una proteína de 244 aminoácidos expresada, aparentemente, de manera exclusiva en el tejido adiposo. La adiponectina es el transcrito más abundante en el tejido adiposo y se secreta al torrente circulatorio, constituyendo una fracción elevada del total de las proteínas plasmáticas. Paradójicamente, las concentraciones plasmáticas de adiponectina están disminuidas en los pacientes obesos y aumentan con la pérdida de peso. Las funciones fisiológicas de la adiponectina no han sido esclarecidas totalmente. Parece ser que incrementa la sensibilidad insulínica y previene la acumulación de lípidos en el músculo esquelético y en el hígado, aumentando su oxidación.

Aunque las concentraciones de adiponectina se encuentran disminuidas en pacientes obesos y en pacientes con EC, se desconoce tanto el riesgo cardiovascular que conlleva la hipoadiponectinemia para los pacientes obesos, como los mecanismos moleculares que expliquen el por qué los pacientes obesos presentan bajas concentraciones de adiponectina. Una posible explicación, podría residir en el desarrollo de resistencia a la leptina con hiperleptinemia, que tiene lugar en la obesidad humana, dado que ratones db/db, con leptinorresistencia debida a la carencia genética del receptor de leptina, presentan concentraciones plasmáticas de adiponectina y expresión en tejido adiposo disminuidas.

La finalidad del presente estudio consistió en analizar en qué medida las concentraciones plasmáticas de adiponectina se ven reguladas *in vivo* por la leptina en un modelo murino de obesidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Con objeto de estudiar el efecto de la leptina sobre la expresión de adiponectina *in vivo* se utilizaron 30

ratones macho adultos de aproximadamente 10 semanas de edad ob/ob (carentes genéticamente de leptina) y 10 ratones *wild type* (C57BL/6, *background* genético de los ob/ob) de igual sexo y edad, que se utilizaron como control. Los animales se distribuyeron en 4 grupos, *wild type* tratados con vehículo (PBS); ob/ob-veh: grupo de animales obesos tratados con vehículo (PBS); ob/ob-lep: grupo de animales obesos tratados con leptina (1 mg/kg de peso corporal/d) y, por último, ob/ob-pf: grupo de animales obesos que recibieron la misma cantidad de alimento ingerida por el grupo tratado con leptina (*pair fed*) y tratados, a su vez con PBS. Se introdujo el último con el fin de tener un grupo control donde las diferencias biológicas encontradas no sean atribuibles a un menor consumo de alimento, por el efecto inhibitor del apetito que produce la leptina.

Tratamiento y determinaciones bioquímicas

Los animales fueron tratados con leptina recombinante o vehículo (PBS) por vía intraperitoneal durante 17 días, transcurridos los cuales se procedió a su sacrificio. Se registró el peso corporal y se obtuvieron la sangre y el tejido adiposo blanco epididimal, que fueron congelados a -86°C, hasta su posterior utilización. Se realizaron determinaciones de insulina y adiponectina mediante ELISA. Las condiciones de mantenimiento y manipulación de los animales estuvieron en todo momento de acuerdo con la normas éticas de experimentación animal de la Universidad de Navarra, que coinciden con la normativa vigente de la Unión Europea (Directiva del Consejo 86/609/CEE).

Análisis estadístico

El análisis de las diferencias entre los diferentes grupos de animales se realizó mediante ANOVA o *Kruskal-Wallis*, según fue apropiado y el correspondiente test *a posteriori*.

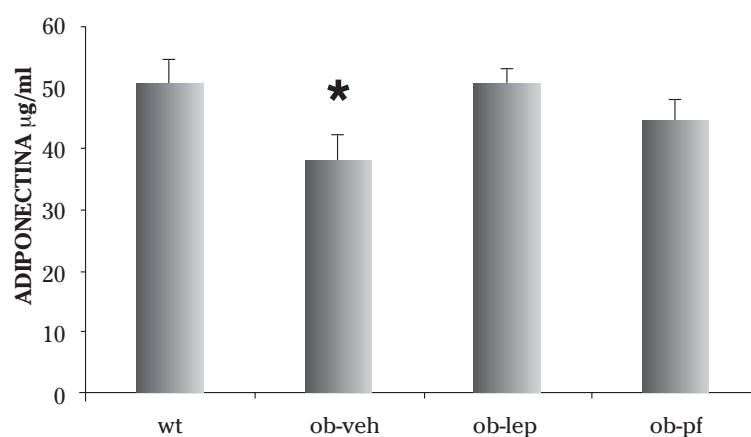
RESULTADOS

Como puede apreciarse en la tabla 1, el tratamiento produjo una notable disminución de la ganancia de peso corporal de los ratones obesos a lo largo del tratamiento. El tratamiento con leptina también produjo una notable reducción en la cantidad de alimento ingerida, la cual se encontraba muy aumentada en los ratones ob/ob. Los datos reflejados en la figura 1 indican que los ratones ob/ob, que desarrollan obesidad extrema por déficit genético de leptina, muestran unas concentraciones circulantes de adiponectina significativamente menores que sus congéneres delgados. El

Tabla 1. Características de los ratones *ob/ob*. Efecto de la leptina.

	wt	<i>ob/ob</i>	<i>ob/ob</i> + leptina	<i>ob/ob</i> pair-fed
Peso inicial, g	22,9 ± 0,9	40,4 ± 2,9*	40,2 ± 2,4*	40,4 ± 3,7*
Peso final, g	23,5 ± 1,0	46,5 ± 4,8*	43,1 ± 2,0*	40,7 ± 6,2*†
Incremento de peso, g	0,6 ± 0,5	6,1 ± 2,4*	2,9 ± 1,1‡§	0,4 ± 2,7§¶
Ingesta diaria, g	3,2 ± 0,2	5,5 ± 0,5*	4,6 ± 0,6*§	4,7 ± 0,6*§
Insulina, ng/ml	0,27 ± 0,14	13,43 ± 3,77*	6,71 ± 4,46#†	12,76 ± 7,11*¶

Media ± SD, **P*<0.001 vs wt, †*P*<0.01 vs *ob/ob*, ‡*P*<0.05 vs wt, §*P*<0.001 vs *ob/ob*, ¶*P*<0.01 vs *ob/ob* + Leptin, #*P*<0.01 vs wt, ***P*<0.05 vs *ob/ob*

**Figura 1.** Concentraciones séricas de adiponectina en los animales de los distintos grupos experimentales. *wt* veh: grupo de animales control (*wild type*) tratados con vehículo (PBS); *ob/ob*-veh: grupo de animales obesos tratados con PBS; *ob/ob*-lep: grupo de animales obesos tratados con leptina (1 mg/kg de peso corporal/d); *ob/ob*-pf: grupo de animales obesos que recibieron la misma cantidad de alimento ingerida por el grupo tratado con leptina (*pair fed*) y tratados, a su vez, con PBS. n=10. **P*<0,05 vs wt y *ob/ob*-lep.

tratamiento con leptina devolvió las concentraciones de adiponectina a valores casi normales. El grupo pair-fed presentó valores tendentes a la normalidad, pero que no presentaron diferencias significativas con los *ob/ob* sin tratar ni con los *ob/ob* tratados.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se ha evaluado el impacto que tiene la ausencia de leptina por déficit genético (ratones *ob/ob*) en las concentraciones circulantes de adiponectina y el efecto, sobre esta adipokina, de la administración de leptina. El tratamiento con leptina produjo una disminución en la ganancia de peso en los ratones *ob/ob*, similar a la descrita en trabajos previamente publicados. La disminución ponderal observada, puede atribuirse, al menos en parte, a la reducción de la disminución de la ingesta inducida por la leptina, ya que es bien conocido el efecto anorexígeno inducido por esta hormona.

Los ratones *ob/ob* presentaron unas concentraciones de adiponectina significativamente menores que las de los ratones normales. Es bien conocido que la obesidad en humanos se acompaña de una disminución en los niveles circulantes de adiponectina, efecto también

observado en los ratones *ob/ob*. El tratamiento con leptina durante 17 días produjo un aumento significativo de la adiponectinemia. Este hecho se podría atribuir a la disminución observada en la ganancia de peso, o a la disminución en la ingesta, que tiene lugar en los ratones que recibieron leptina. Sin embargo, los animales que fueron alimentados con la misma cantidad de pienso que los que recibían leptina, aunque sus concentraciones de adiponectina no presentaron diferencias con los tratados, tampoco llegaron a alcanzar valores normales, no presentando diferencias estadísticamente significativas con los *ob/ob* sin tratar. Por lo tanto, podemos concluir que la leptina tiene efecto sobre los niveles circulantes de adiponectina, que va más allá del porcentaje de grasa y la ingesta de alimento.

Se puede concluir que el incremento del tejido adiposo, que tiene lugar en los ratones obesos deficientes en leptina, se ve reflejado en una disminución en las concentraciones circulantes de adiponectina. El tratamiento con leptina devuelve las concentraciones de adiponectina a valores normales. La leptinemia parecen desempeñar un papel regulador sobre los niveles de adiponectina.

Estudio sobre los determinantes de salud en el Valle de Salazar

F. Guillén¹, L. Blázquez^{1,2}, F. Sánchez Sanchis², C. Floristán², A. Martínez Zubiri², M. P. Montero², F. Portillo², A. Ventura², M. C. Sánchez Vázquez², M. A. Alzuela², I. Aguinaga¹

1. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Pública de Navarra. Pamplona.

2. Servicio Navarro de Salud. Pamplona.

FUNDAMENTO

El objetivo de esta investigación era estudiar el estilo de vida, fundamentalmente la nutrición y el ejercicio físico mediante la realización de una encuesta de salud, acompañada de un examen de salud en población del Valle de Salazar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un examen de salud junto con el cuestionario a una muestra aleatoria de personas del Valle de Salazar. El examen de salud incluyó medición de peso y talla, índice cintura/cadera, impedanciometría, y densitometría. La densitometría se realizó con un densitometro marca Lunar® modelo PIXI, que realiza la imagen para diagnosis en el calcáneo y proporciona el Z-score ajustado por edad, peso y etnia. Los ítems de la encuesta correspondientes al consumo de alimentos están basados en el cuestionario de Willett, utilizado en el estudio de los hábitos y salud de las componentes de la *American Nurses Association*, que ha sido desarrollado y validado por Martín-Moreno (1993).

A partir de los consumos de calorías, macronutrientes y micronutrientes se calculan los cuartiles de consumo de los mismos, ajustados por calorías. En el análisis estadístico se ha calculado la ji cuadrado exacta en las tablas de contingencia.

RESULTADOS

A partir de los consumos de calorías, macronutrientes y micronutrientes se calculan los quintiles de consumo de los mismos. Los resultados muestran que casi la mitad de la población, es decir un 47,9% tienen problemas de sobrepeso. Aunque los intervalos de confianza son muy amplios debido a lo reducido de la muestra, podemos afirmar que al menos un 30,59% de la población del Valle de Salazar presenta osteopenia. Se ha detectado una asociación entre un elevado consumo de vitamina A y osteoporosis, lo mismo ocurre con la ingesta de β -carotenos y osteoporosis. El 100% de las personas con osteoporosis se encuentra en el cuarto cuartil de ingesta ajustada por calorías de β -carotenos y vitamina A. Este hallazgo es coherente con la bibliografía científica en donde se muestra que un elevado consumo de vitamina A, aumenta el riesgo de fracturas, así como los efectos adversos sobre la densidad ósea.

Por último se ha encontrado una asociación protectora entre el consumo de ácido eicosapentaenoico (EPA), aparece como protector, observándose que el 100% de los personas situadas en el cuarto cuartil, tienen una densitometría ósea normal (Tabla 1). Estos hallazgos concuerdan con los resultados de la bibliografía que muestran cómo la ingesta de EPA puede reducir la osteoporosis (Sun 2004), probablemente debido una inhibición de la generación de osteoclastos (Sun 2003). Así mismo se ha sugerido la futura utilización del EPA como medicamento para el tratamiento de la osteoporosis.

Tabla 1. Distribución de los entrevistados según su consumo de ácido cis eicosapentaenoico en cuartiles ajustados por calorías y según los resultados de la densitometría.

Cuartiles	Valoración densitometría			Total
	Normal	Osteopenia	Osteoporosis	
1	25,0%	75,0%		100,0%
2	25,0%	75,0%		100,0%
3	33,3%	50,0%	16,7%	100,0%
4	100,0%			100,0%
Total	45,8%	50,0%	4,2%	100,0%

$\chi^2 = 12,518$, GL= 6 $P_{\text{exacta}} = 0,025$

Modelización espacio-temporal de tasas de incidencia y de mortalidad en Navarra

M. D. Ugarte¹, A. F. Militino¹, B. Ibáñez¹, E. Ardanaz², C. Moreno²

1. Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Universidad Pública de Navarra. Pamplona.

2. Sección de Enfermedades no Transmisibles y Estadísticas Vitales. Instituto de Salud Pública de Navarra. Pamplona.

FUNDAMENTO

El análisis de la variabilidad espacial del riesgo de mortalidad o de incidencia de las distintas enfermedades y su representación en un mapa son tareas fundamentales dentro de la investigación epidemiológica. Identificar zonas básicas de salud en las que existe mayor riesgo de contraer o desarrollar una enfermedad o de morir por una causa determinada es una tarea relevante para que los epidemiólogos y profesionales de la salud pública actúen de forma eficaz en la elaboración de programas de prevención o en la toma de decisiones relativas a la asignación de fondos sanitarios. En las últimas décadas, la mejora en la calidad de los conjuntos de datos y los últimos avances informáticos y estadísticos han permitido que se puedan llevar a cabo estudios epidemiológicos en los que se incluye el espacio y el tiempo simultáneamente. Es decir, los nuevos procedimientos permiten evaluar no sólo la variabilidad geográfica sino también la evolución temporal de los riesgos. En este trabajo se proponen modelos para estudiar la variabilidad espacio-temporal de los riesgos de mortalidad e incidencia de cáncer global y otros tumores específicos por zonas básicas de salud en Navarra durante los quinquenios 1983-1987, 1988-1992 y 1993-1997.

MATERIALES Y MÉTODOS

El Instituto de Estadística de Navarra proporcionó los datos de mortalidad e incidencia de cáncer clasificados según CIE 10 para el período considerado 1983-1997. Además de estudiar mortalidad e incidencia de cáncer global para cada género, se consideró de interés analizar mortalidad e incidencia para algunos tumores específicos de especial relevancia. Estos son, en hombres, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de colon y recto, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de encéfalo y linfoma no Hodgkin, y en mujeres, cáncer de mama, cáncer de colon y recto, cáncer de cuerpo de útero y útero no especificado, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de encéfalo y linfoma no Hodgkin. Se tomó como población de referencia la población navarra por grupos de edad correspondiente al padrón de población de 1986 para el período 1983-1987, al censo de población de 1991 para el período 1988-1992 y al padrón de población de 1996 para el período 1993-1997. Se utilizó la zonificación sanitaria incluida en la publicación del Gobierno de Navarra relativa al censo de población de 1991 pero considerando Pamplona y Tudela como sendas zonas básicas de salud sin desagregaciones. De este modo se consideraron finalmente 40 zonas básicas de salud. La estandarización por grupos de edad para el cálculo de valores esperados se realizó considerando 19 grupos de edad: <1, (1,5), (5,10), (10,15),..., ≥ 85.

Para estimar los riesgos relativos de mortalidad e incidencia por cáncer global para el período completo 1983-1997, se ha utilizado el modelo discreto de mixturas de Poisson, ya que tanto los datos de mortalidad como los de incidencia mostraban variabilidad extra con respecto al modelo homogéneo de Poisson y ausencia de dependencia espacial. Se han investigado además cinco procedimientos distintos para la obtención de intervalos de confianza para los riesgos. El primero está basado en la distribución asintótica de los estimadores de los riesgos y en el principio de información faltante y lo hemos llamado método asintótico o naïve empírico-bayesiano. El resto de procedimientos están basados técnicas de remuestreo, o técnicas bootstrap. En concreto se han estudiado las probabilidades de cobertura (*coverage probabilities*) del método denominado naïve-modificado, del bootstrap-asintótico, del método del percentil y de un método denominado BC (bias-corrected). Los intervalos de confianza permiten detectar en qué zonas básicas existe un riesgo relativo significativamente mayor o menor al riesgo de incidencia o mortalidad por cáncer global en el conjunto de la Comunidad Autónoma de Navarra.

Por otro lado, para estimar los riesgos en cada quinquenio del estudio de manera que sean comparables en el tiempo, se han utilizado dos métodos. Para incidencia de cáncer de útero en mujeres, mortalidad por cáncer de encéfalo en hombres y mortalidad por cáncer de mama, cáncer de útero y cáncer de encéfalo en mujeres no se ha detectado variabilidad extra con respecto al modelo homogéneo de Poisson y se ha utilizado la extensión en el tiempo de la metodología clásica. Para el resto de causas sí se ha detectado variabilidad extra, y por tanto se ha derivado una extensión del modelo discreto de mixturas de Poisson que incorpora la componente temporal, posibilitando el análisis conjunto en el espacio y el tiempo.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Para analizar la significación de los riesgos relativos de mortalidad e incidencia por cáncer global en el período completo se recomienda el uso de los intervalos de confianza BC-bootstrap, ya que son los que proporcionan mejores probabilidades de cobertura. Tanto para incidencia como para mortalidad se obtienen en ambos géneros algunas zonas básicas con riesgos significativamente altos y bajos. En particular, cabe destacar que Pamplona alcanza un riesgo significativamente alto en todos los conjuntos de datos analizados. Esto puede deberse a que el período global es demasiado amplio para que el censo de población de 1991 recoja los cambios poblacionales sufridos en la capital en los últimos años, por lo que se recomienda comple-

mentar estos resultados con los obtenidos en el estudio espacio-temporal, donde se considera la información por quinquenios.

Con relación a los resultados del estudio espacio-temporal, se observan diferencias en los riesgos de mortalidad tanto en el espacio como en el tiempo. A modo de ejemplo, en la figura 1 se presentan los riesgos estimados correspondientes a incidencia de cán-

cer total en hombres mediante el modelo espacio-temporal de mixturas de Poisson. La representación gráfica muestra por un lado una tendencia temporal creciente, y por otro la distribución geográfica del riesgo en cada quinquenio. Es importante notar que los resultados de los tres mapas son comparables entre sí y que un valor mayor que uno indica que el riesgo estimado en esa zona básica de salud es superior al riesgo global de Navarra en el período completo.

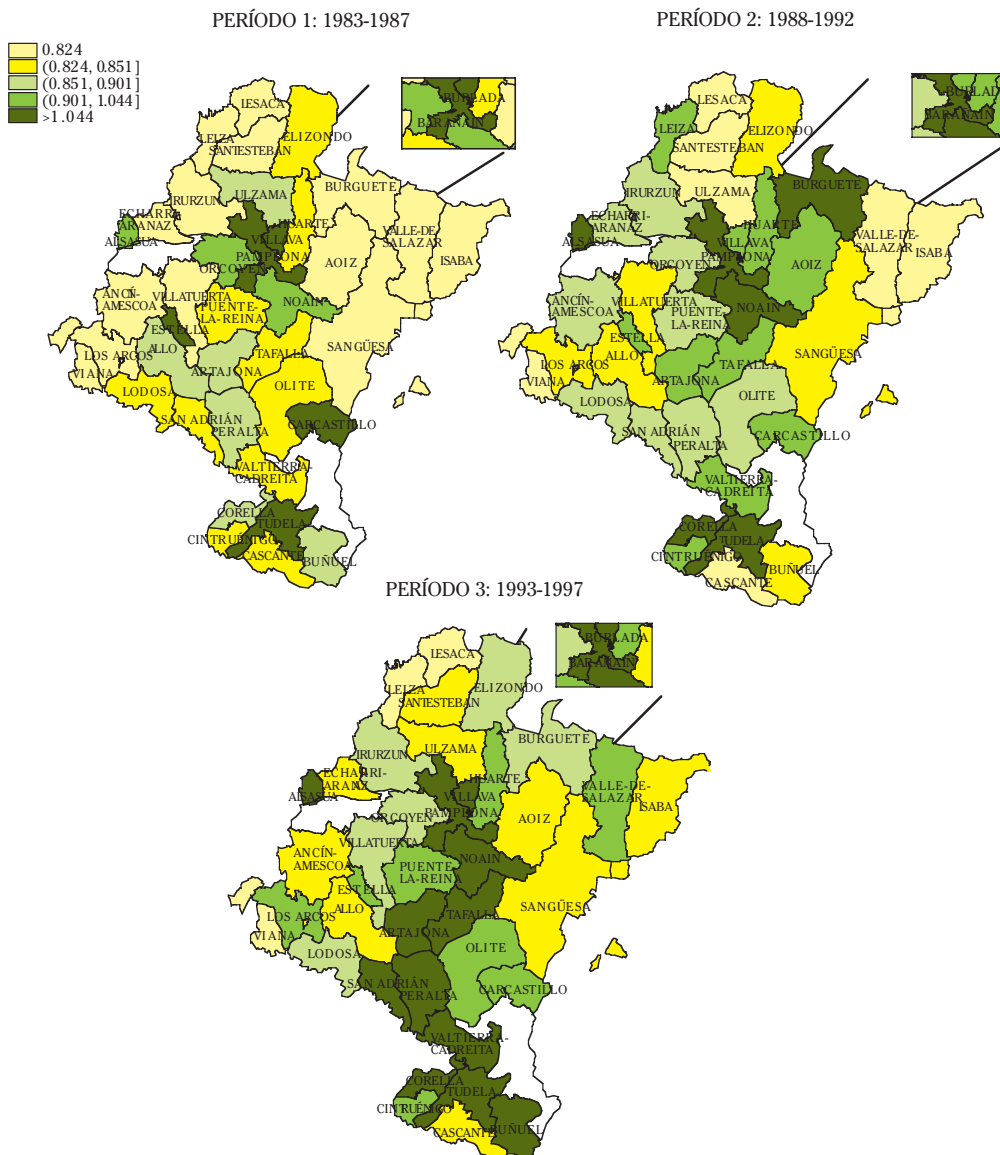


Figura 1. Sir para cáncer global en hombres. Modelo de mixturas espacio-temporal.