

Inhibición de la expresión génica de proteínas del virus de la hepatitis B utilizando diferentes sistemas de inhibición

G. González

Departamento de Medicina Interna. Universidad de Navarra. Pamplona.

FUNDAMENTO

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) constituye una de las enfermedades infecciosas más frecuente a nivel mundial, más de 350 millones de personas en todo el mundo y en España afecta a un 2% de la población. Aunque en la mayor parte de los casos la infección conduce al desarrollo de una hepatitis aguda con posterior recuperación clínica, un porcentaje significativo de enfermos progresan hacia la infección crónica con el consiguiente riesgo de desarrollar cirrosis hepática y hepatocarcinoma. El IFN α constituye, junto con los análogos de nucleosidos: lamivudina, adefovir y entecavir el tratamiento actual de esta patología. La tasa de respuesta al tratamiento con el IFN α recombinante es de un 30% y sus efectos adversos son frecuentes y moderadamente importantes. Los análogos de nucleosidos aunque muy activos en la inhibición de la replicación viral, inducen la aparición de resistencias durante el tratamiento y la retirada del fármaco supone casi invariablemente la reactivación de la infección. Por todo ello existe la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas más eficaces que substituyan o complementen las actualmente disponibles frente a la infección por el virus de la hepatitis B.

Una de las posibilidades más atractivas consiste en utilizar sistemas que bloqueen la información genética de los virus. La inhibición de la síntesis de proteínas esenciales para la biología del virus nos permitirá eliminar o reducir la infección viral. Para ello, durante los últimos años se han desarrollado una serie de estrategias que tienen como objetivo la interferencia con RNAs mensajeros específicos. Estas técnicas basadas en híbridos de la molécula inhibidora con el RNA diana incluyen moléculas como los ribozimas, los oligos antisentido, los RNAs interferentes (iRNAs) y un sistema desarrollado en nuestro laboratorio los snRNAs U1 modificados. Estos dos últimos métodos son los que han producido los mejores resultados tanto por su especificidad como por el porcentaje de inhibición que se obtiene.

Una limitación muy importante para la eficacia terapéutica de estos sistemas de inhibición es conseguir su vehiculización al órgano o célula diana. Por esta razón en este proyecto hemos trabajado también en la caracterización de vectores para traducir el hígado de forma eficaz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de los snRNA U1. Se han elegido secuencias muy conservadas del genoma viral, para evitar que mutaciones puntuales en el genoma viral hagan que el virus escape a la inhibición.

Construcción de los plásmidos. Para la expresión snRNA U1 modificados utilizaremos un plásmido que produce Us a partir del propio promotor de U1.

Análisis de la inhibición de la expresión génica *in vitro*. Se transfectaron células HEPG2-2215 que expresan el genoma del virus de la hepatitis B. 2 días después de la transfección hemos cuantificado por Elisa la cantidad de antígeno de superficie (SAg) y antígeno E (EAg) presentes en el sobrenadante de las células. Comparado con células control transfectadas con un snRNA U1 agreste.

Construcción y producción de vectores basados en el virus adenoasociado serotipos 1, 5, 6 y 8. Los virus AAV recombinantes expresan el gen de la luciferasa cuya expresión puede ser analizada y cuantificada *in vivo* utilizando una cámara CCD.

RESULTADOS

Desarrollo de los sistemas de inhibición. Construimos cuatro plásmidos que codifican moléculas de U1 snRNA capaces de interaccionar con el extremo 3' de los mRNAs del virus de la hepatitis B. Con ellos hemos transfectado células 2215 que expresan el genoma del virus de la hepatitis B se han transfectado con plásmidos que expresan el U1 agreste (U1WT) o combinaciones de dos (U1+U3) o cuatro (Mix) plásmidos que codifican para U1 snRNAs modificados en su extremo 5' para hibridar con los mRNAs del virus de la hepatitis B. Dos días después de la transfección se cuantificó mediante Elisa la cantidad de antígeno de superficie (SAg) y de antígeno E (EAg). Células presentes en el sobrenadante de las células. Comparado con células control transfectadas con un snRNA U1 agreste, ninguno de los RNAs construido fue capaz de disminuir la producción de los antígenos virales. Sin embargo, combinaciones de dos RNAs transfectados en la misma célula permiten disminuir la acumulación de EAg y combinaciones de los cuatro RNAs, permiten inhibir la producción de los dos antígenos virales (Fig. 1 A).

Selección del vehículo apropiado para la transfección génica al hígado. Hemos construido y producido AAVs con cápsides de los serotipos 1, 5, 6 y 7 portadores de dos tipos de estructuras genómicas diferentes una de cada sencilla y otra de doble hebra. Todos los virus portaban el gen reportero luciferasa y tras su inyección en ratones por vía intravenosa se analizó la expresión del trasgen en el hígado *in vivo*.

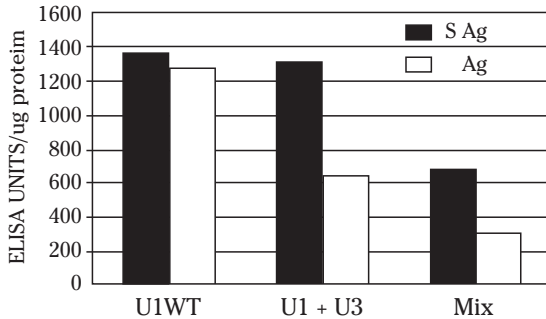
A partir de estos resultados (Fig. 1B) podemos concluir que el AAV serotipo 8 es el mejor vector para la transducción de los hepatocitos murinos. También

podemos concluir que la estructura genómica de doble hebra nos permite alcanzar mayores niveles de expresión. Por estas razones hemos determinado que el vector que vamos a utilizar para realizar la realización de los ensayos de inhibición de la replicación del HBV va a ser un AAV serotipo 8 de doble hebra.

CONCLUSIONES

Hemos diseñado cuatro snRNAs U1 modificados que administrados en combinación a células que per-

miten la replicación del virus de la hepatitis B son capaces de inhibir en mas de un 50% la expresión de proteína virales. Por otro lado hemos caracterizado un sistema de vehiculización basado en virus adenoasociados capaces de transferir con una gran eficacia material genómico al hígado. En estos momentos estamos en condiciones de vehiculizar nuestro sistema de inhibición al hígado con objeto de inhibir en el hepatocito la replicación del HBV.



B

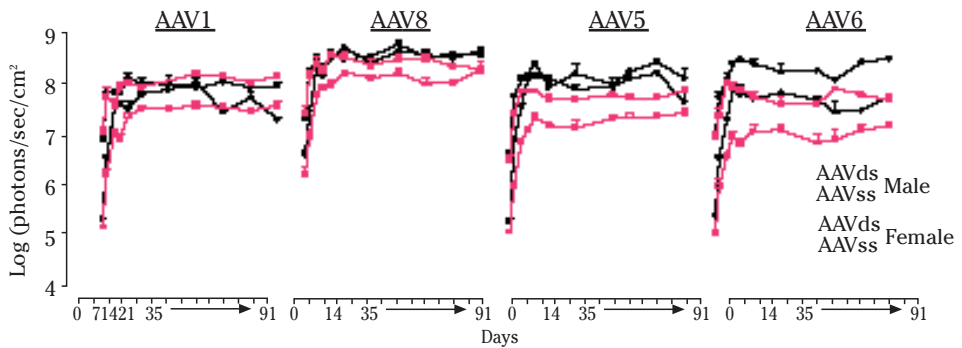


Figura 1. A. Inhibición de la producción de antígenos del virus de la hepatitis B en células HepG2-HBV tras haber sido transducidas con plásmidos que expresan U1 modificados.

B. Análisis de la expresión de luciferasa in vivo tras inyección de AAVs de los serotipos 1,8,5 y 6 en ratos BALB/c hembras y machos. El AAV serotipo 8 es el mejor serotipo para la transducción del hígado.

Opiniones y actitudes de la sociedad navarra hacia la sanidad en la Comunidad Foral. 2006

F. San Miguel

Institución Futuro. Gorraiz. Navarra.

FUNDAMENTO

Las encuestas de satisfacción y opinión sobre los servicios públicos pueden ser utilizados como un indicador de su calidad. Por ello, La Institución Futuro realizó una encuesta a una muestra de la población navarra en 2004 con el fin de valorar su satisfacción con el sistema público de salud. No hay que olvidar que como apunta Street (2006), este tipo de estudios de satisfacción no aportan información sobre el efecto que la asistencia sanitaria tiene sobre la salud de la población, tampoco sobre cuáles deberían ser las medidas que deberían ser desarrolladas y no permiten valorar la evolución de la atención a lo largo del tiempo.

Por ello, se vuelve a realizar la misma encuesta pasados dos años, con el fin de medir la evolución de la satisfacción de los ciudadanos con el sistema sanitario público y la posible influencia de las políticas públicas desarrolladas en este periodo.

Además, la encuesta aborda no sólo cuestiones relacionadas con la satisfacción sino la opinión sobre aspectos considerados importantes en la atención sanitaria, como la información que reciben los ciudadanos, el control del gasto sanitario o la atención farmacéutica. En esta edición, el estudio hace hincapié y profundiza además en la utilización y valoración de los servicios de urgencias hospitalarias, la opinión sobre las listas de espera y la información sobre la salud y la atención sanitaria que reciben los ciudadanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realiza una encuesta telefónica a una muestra aleatoria de 302 individuos mayores de 18 años de la población navarra, lo que representa un error muestral de cerca del 6% (en el supuesto del muestreo aleatorio simple). Además se realizaron 200 encuestas adicionales siguiendo la misma metodología para las preguntas tipo Likert, las preguntas de carácter sociodemográfico y las dos primeras preguntas sobre uso de los servicios sanitarios y satisfacción con los mismos. Por ello, al presentar los resultados, en algunos casos se cuenta con 502 observaciones y 302 en otros.

La encuesta se realizó a finales de octubre (302 entrevistas) y a comienzos de diciembre de 2006 (las 200 adicionales), prácticamente dos años después de la realizada en 2004.

El análisis de la información obtenida se basa principalmente en la comparación de distribuciones de frecuencias para cada una de las cuestiones tratadas. La existencia de relaciones significativas de asociación entre diferentes variables se contrasta mediante el estadístico Chi Cuadrado utilizando el programa SPSS 14.0. en los aspectos más interesantes se comparan los resultados con los obtenidos en 2004.

RESULTADOS

De forma general, al igual que en 2004, la mayoría de los encuestados realiza una valoración satisfactoria

o muy satisfactoria de la atención (Tabla 1) y la información recibida, destacando la motivación y la preparación del personal sanitario por una mayoría de la muestra. Se hace una buena valoración también del servicio de urgencias hospitalarias. Destaca el hecho de que el 22,2% de las personas que fueron a urgencias consideraba que su problema era leve y el 21% desconocía que pudiera acudir a un centro de urgencias de Atención Primaria. La mayoría de las personas (71%) considera que el tiempo que tuvo que esperar fue razonable o corto y el 63% reconoce que su problema fue atendido con seriedad, profesionalidad e interés.

La principal demanda, por casi la mitad de la muestra, en relación a la atención primaria es conseguir cita de forma rápida, y de forma contraria quizá a lo que cabría esperar y los resultados obtenidos en 2004, el 30% reclama más tiempo con su médico (Figura 1).

En cuanto a las secciones que se han ampliado en esta edición, se aprecia un cambio en los medios utilizados por la población para obtener información sobre temas relacionados con la salud y la asistencia sanitaria. Este resultado es más visible para los más jóvenes y de mayor nivel educativo, que tienden a utilizar fuentes alternativas de información, especialmente Internet. El 50% de los encuestados cree que los ciudadanos deberían estar mejor informados y recibir más información sobre temas relacionados con la salud y la atención sanitaria y de forma mayoritaria se piensa que debe ser la administración y los médicos de cabecera quien proporcione dicha información.

De forma mayoritaria se reconoce que es necesario controlar el gasto sanitario siempre que ello no afecte a la calidad asistencial. En cuanto a la disponibilidad de los individuos a participar en mayor medida en la financiación de la atención, se percibe una ligera mayor predisposición en 2006. Cuando no se consideran las respuestas indecisas, el 46% de la muestra estaría dispuesta a aceptar subidas impositivas (28% en 2004) y el 50% aceptaría tener que pagar por algunos servicios (40% en 2004). Esta opinión es más clara entre las personas más jóvenes y de mayor nivel educativo.

Las cuestiones referidas a la farmacia y los medicamentos indican también algunos cambios con respecto a 2004 y de forma clara también en este caso por parte de los grupos de población más jóvenes y de mayor nivel educativo. Resulta positivo comprobar que el 47% declara que el farmacéutico les ofrece medicamentos más baratos e igualmente eficaces que los recetados por su médico y cerca del 60% estaría dispuesto a aceptar dichas sustituciones. Aumenta también (al 70%) la opinión de que se abusa del consumo de medicamentos cuando no hay que pagar por ellos.

El dato más negativo se refiere a las listas de espera quirúrgicas. Más del 70% de los encuestados piensa que las listas de espera son demasiado largas debido principalmente a la falta de recursos humanos y materiales (69%). El crecimiento que han experimentado las listas

de espera en los últimos años en Navarra se percibe también a través de la opinión de los encuestados: la gran mayoría opina que éstas han aumentado en el último año así como el número de personas que tiene que esperar más de seis meses. Por otra parte, más del 80% de los encuestados cree que las listas de espera en Navarra son iguales o menores que en otras CCAA (aunque un 50% no podría valorarlo). Preguntados sobre su disponibilidad a pagar para reducir las listas de espera, un 50% admite que dependería de su estado de salud, y son más los que no estarían dispuestos frente a los que sí.

Esta cuestión ha podido influir negativamente en la percepción sobre la evolución de la calidad asistencial en los últimos años. Ante la afirmación “la calidad de la sanidad navarra ha descendido en los últimos años”, aumenta la proporción de personas que dice estar de acuerdo, del 28% en 2004 al 42% en 2006.

CONCLUSIÓN

La principal conclusión se refiere a la satisfacción y la valoración positiva que los encuestados hacen de la sanidad pública navarra en general. Algunos datos son llamativos, como la relativa elevada proporción de

los encuestados que afirma estar dispuesto a contribuir a la financiación pública. Esto puede deberse a que la muestra utilizada en 2006 es algo más joven y de mayor nivel educativo que la empleada en 2004 y este subgrupo poblacional, como se ha mencionado se distingue de forma clara en cuanto a sus opiniones y actitudes ante la sanidad pública.

Los resultados pueden sugerir también que las personas más jóvenes y de mayor nivel educativo se distinguen por su mayor disponibilidad a jugar un papel más activo en la provisión de atención sanitaria, demandan más información, tienen una mayor conciencia de la necesidad de controlar el gasto sanitario y están más dispuestos a asumir cierta cofinanciación del mismo.

De cara al futuro, destacan dos cuestiones que deberán ser tenidas en cuenta por los gestores del sistema: el control de las listas de espera quirúrgicas, su gestión por “tipologías” de pacientes y la adecuada gestión de sus recursos humanos. Otro elemento sobre el que existe también espacio para la mejora es la referente a la corresponsabilidad del ciudadano, tratada de manera tímida en el III Plan de Salud 2006-2012.

Tabla 1. Satisfacción con los servicios sanitarios.

	Valoración satisfactoria o muy satisfactoria de la atención (%)	
	2004	2006
Atención primaria	96,1	94,6
Urgencias hospitalarias	86,1	87,6
Urgencias de atención primaria	91,3	91
Radiografía	98,5	99,2
Mamografía	100	97,1
Ecografía	100	98,1
Scanner	100	95,5
Resonancia Magnética	100	90,9
Consulta con el especialista	94,2	93,9
Atención Hospitalaria	100	97,2

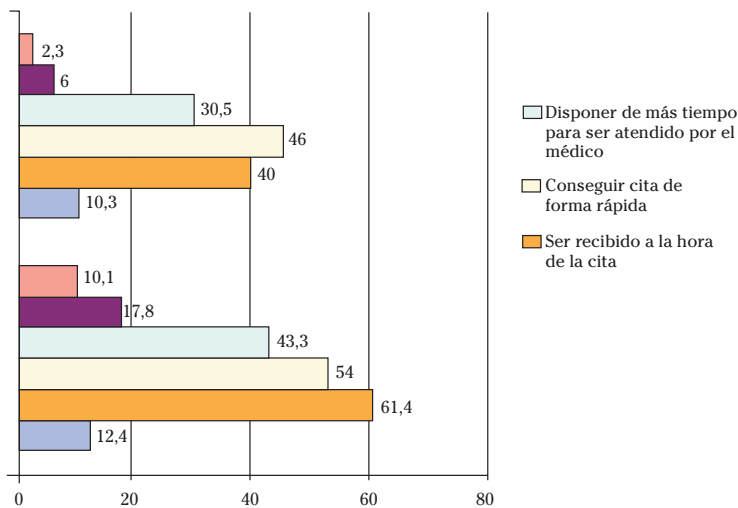


Figura 1. Principales demandas sobre la Atención Primaria.

Carcinoma urotelial. Detección de alteraciones cromosómicas mediante hibridación in situ fluorescente y su significado en la progresión de la enfermedad como marcadores de capacidad de recidiva tumoral

E. Urbiola, Y. Laplaza, R. Guarch, E. Almudévar, S. Rázquin, M. Ruiz Ramos, A. Rivas, A. Puras

Hospital Virgen del Camino. Pamplona.

INTRODUCCIÓN

En el carcinoma urotelial se han investigado dos vías de carcinogénesis: mutaciones de p53 y anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, principalmente aneusomías y deleciones. La primera vía interviene más en casos de carcinoma de alto grado de patrón sólido o plano mientras que la segunda se relaciona con carcinomas papilares de bajo grado, superficiales y con gran capacidad de recidiva.

El diagnóstico del carcinoma urotelial sigue basándose en la biopsia y el seguimiento de los pacientes se realiza mediante cistoscopias y citologías de orina. En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas. Algunas alteraciones cromosómicas (aneuploidías, deleciones) se pueden detectar mediante hibridación in situ fluorescente (FISH). Se ha observado que las alteraciones más frecuentes en cáncer urotelial son las polisomías del 3, 7 y 17 y la deleción 9p21, en el cromosoma 9, donde se localiza el gen supresor tumoral CDKN2A/p16. La pérdida de este gen se considera un hecho crítico en la recidiva y progresión del carcinoma urotelial. No obstante, no se sabe si reflejan la existencia de una neoplasia o un estado de inestabilidad del urotelio que propicia el que se desarrolle ésta, y de qué forma evolucionan estas alteraciones a lo largo de la progresión de la enfermedad. Esto impide que, en el momento actual, este método de detección pueda aplicarse de manera que disminuya el número de cistoscopias necesarias para el seguimiento del paciente. Este estudio pretende analizar las alteraciones cromosómicas observadas en la progresión de la enfermedad en casos de cáncer urotelial recidivante desde el tumor primario hasta la recidiva y ver si se puede predecir su curso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo: Se seleccionaron 83 pacientes (archivo 1998-2002) con carcinoma urotelial recidivante, tomando un bloque de parafina del tumor primario (83) y otro de la o las recidivas (96). Se contruyeron 12 bloques multitejidos con un Tissue-arrayer MTA1 de *Beecher Instruments Inc.*, con aguja de 2.0 mm. Para la FISH se utilizó el "Urovision Bladder Cancer Recurrence Kit" de Vysis, con un cóctel de sondas (CEP 3, CEP 7, CEP 17, y LSI 9p21), y se procedió según instrucciones del fabricante. Se valoró cada sonda CEP considerando como positiva cuando al menos un 10% de las células valorables mostraban más de dos señales por núcleo. La sonda 9p21 se valoró de forma similar, considerándose deleción si se observaba en un 25% de las células. La inmunohistoquímica (IHQ) se llevó a cabo en un sistema *BondMax* de *Vision Biosystems* automatizado, con p53 monoclonal (clon DO-7) Dako, prediluido, y p16 monoclonal (clon 16P07) MD a 1:50.

Estudio prospectivo: Se seleccionaron muestras de orina de 24 pacientes con sospecha de carcinoma de vejiga procediéndose de forma similar a la descrita en el estudio prospectivo. En las cistoscopias se realizó toma de biopsias en los casos sospechosos.

RESULTADOS

Los resultados se exponen en la tabla 1 (estudio retrospectivo) y tabla 2 (estudio prospectivo).

DISCUSIÓN

En la génesis del carcinoma urotelial se han planteado dos grupos con diferente carcinogénesis: los tumores papilares exofíticos no invasivos, que suponen el 80% de los casos y que tienen un comportamiento recidivante, y los tumores sólidos infiltrantes que tienen un comportamiento agresivo, con invasión, progresión en estadio y metástasis. Entre estos dos grupos hay cierto solapamiento ya que un 10-15% de los tumores papilares progresan hacia los invasivos de alto grado. No se conoce el mecanismo de esta progresión.

Los conocimientos genéticos actuales han propiciado un cambio en la clasificación de los carcinomas uroteliales. Anteriormente, se dividían en superficiales (pTa, pT1 y CIS) e invasivos (pT2-T4). La actual clasificación de la OMS (2004) diferencia tres grupos:

- Neoplasia papilar urotelial de bajo potencial maligno.
- Carcinoma transicional de bajo grado: son tumores papilares no invasivos de bajo grado (antiguos pTa G1-2). Muestran pocas alteraciones génicas, entre ellas pérdidas del cromosoma 9. La aneuploidía se da en menos del 50% de los casos. Las mutaciones de p53 son raras.
- Carcinoma transicional de alto grado: tumores infiltrantes (pT1-4) y tumores no infiltrantes de alto grado (pTaG3 y CIS). Son genéticamente inestables: amplificaciones, mutaciones de p53, aneuploidía en 90% de los casos, pérdida total o parcial del cromosoma 9. La aneuploidía parece estar muy relacionada con el grado y el estadio tumoral.

En nuestro estudio retrospectivo (1998-2002) se han dividido los carcinomas en dos grupos, siguiendo la actual clasificación de la OMS: los carcinomas de bajo grado (126) y los de alto grado (53).

El diagnóstico del carcinoma urotelial y su seguimiento sigue basándose en la cistoscopia y biopsia. Las técnicas de estudio de alteraciones genéticas, como el análisis mutacional no son aplicables al diagnóstico y seguimiento de los pacientes en la práctica. El seguimiento se realiza con cistoscopias y citología,

con una sensibilidad baja para el diagnóstico de tumores de bajo grado.

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas que no han demostrado un incremento en la sensibilidad o bien exigen un gran consumo de tiempo y personal. Algunas alteraciones cromosómicas (aneuploidías, deleciones) se pueden detectar mediante FISH basada en sondas de DNA. Las alteraciones más frecuentes en cáncer urotelial son las polisomías del 3, 7 y 17, y la deleción 9p21, locus del gen supresor tumoral CDKN2A. La pérdida de este gen es un hecho crítico en la recidiva y progresión del carcinoma urotelial.

En la carcinogénesis de los tumores uroteliales se ha visto implicados genes como CDKN2a (p16) (9p21), cuya pérdida se da en el 50% de los tumores independiente del grado y estadio, o p53 (17p13), con mutaciones frecuentes en tumores invasivos.

La aneuploidía en los carcinomas de urotelio se ha relacionado con el grado y estadio. En los tumores de alto grado se refiere hasta en un 90% de los casos, y en los de bajo grado en un 50%. Otros no encuentran polisomías y sí pérdidas del cr. 9 como un evento temprano en la carcinogénesis. En nuestro estudio se confirma la mayor incidencia en los tumores de alto grado (77%) frente a los de bajo (42%). No se observaron diferencias entre los tumores primarios y los recidivados.

El gen CDKN2A localizado en 9p21 está inactivado en muchas neoplasias. Codifica la proteína p16INK4a. Se ha observado en algunos estudios pérdidas del cr. 9 en más del 50% de los tumores uroteliales de cualquier grado y estadio, e incluso llegando en algunos estudios al 90%. Casi siempre es debida a deleciones tanto en tumores superficiales como invasivos.

En nuestro estudio la deleción 9p21 se da en un 71% de los casos de bajo grado y en el 60% de los de alto. En la literatura se describen pérdidas totales o parciales del cromosoma 9 en un porcentaje variable llegando hasta el 90%. Esta diferencia puede deberse a que la sonda utilizada aquí está restringida a la región 9p21 por lo que no detecta pérdidas de otros locus. No obstante, esta región es la de mayor interés ya que aloja el gen CDKN2a (p16).

Combinando las alteraciones numéricas 3, 7 y 17 y la deleción 9p21, se detecta un 88% de tumores con alguna alteración cromosómica, llegando al 91% en los de alto grado. Esto concuerda con estudios previos y demuestra su utilidad en la detección de carcinoma de urotelio. No obstante, siempre habrá un porcentaje de casos (12%) que no será detectado.

En este estudio se han abordado los genes p53 (17p13) y CDKN2a (9p21) (p16) desde dos puntos de vista: mediante la IHQ de las proteínas que codifican (p53 y p16) y con las sondas dirigidas a la región CEP del cr 17 y al locus 9p21 del cr. 9.

En el estudio de p53, los tumores son positivos en un 63%, sin que se observen diferencias entre alto y bajo grado.

La proteína p53 nativa, producto del gen supresor tumoral p53, de vida media corta, interviene en la parada en G1-G0 y G2-M, y en la apoptosis. Si falta, la célula se replica de forma incontrolada. Las mutaciones de p53 resultan en una pérdida de su función, con una p53 mutante de vida media larga que se acumula en el núcleo, por lo que será detectada por IHQ. Sin embargo no todas las p53 mutantes se acumulan y en circunstancias (hipoxia, activación de oncogenes...) puede acumu-

larse p53 nativa, no mutada, en el núcleo y ser detectada. A pesar de esto suele interpretarse la detección IHQ de p53 como indicativo de mutación. Debido a estas circunstancias, el valor predictivo de la p53 en cuanto a pronóstico falla en muchos de los casos.

En nuestro estudio, si comparamos la expresión IHQ de p53 con el número de cr 17 no existe diferencia entre los tumores con polisomía del cr 17 y aquellos con dos copias. Ambos expresan p53 (66 y 64 % respectivamente). Esto podría deberse a que la expresión de p53 es debida a mutaciones, independientemente del número de copias del cromosoma y por tanto del gen. Sin embargo, en los casos con pérdida de uno de los cr. 17 (8%), un 60% eran negativos para p53.

Algunos estudios consideran que la p53 mutante es la causante de inestabilidad genómica ya que las neoplasias que sobreexpresan p53 se acompañan de aneuploidía. Sin embargo no encuentran tampoco una correlación entre la polisomía y la expresión de p53, considerando que hay otros mecanismos implicados que colaboran en la inestabilidad genómica.

En nuestro estudio en un 34% de casos coexisten aumento de copias de cr 17 y negatividad de p53. En estos casos es evidente que la p53, mutada o no, no ha sido la causa de inestabilidad cromosómica. Y que tampoco el aumento de número de copias del cr. 17, y por tanto del gen p53, conlleva incremento de proteína, por lo que tiene que haber diversos fenómenos imbricados (mutaciones, polisomías, silenciamiento por metilación u otras causas) en cada caso en particular.

La expresión IHQ de p16 presenta resultados similares entre los grupos de alto y bajo grado (30% positivos). Comparando los resultados obtenidos en el estudio IHQ y en el de la deleción 9p21, veremos que el 86% de los casos con pérdida homocigota de esta región no expresan p16, y lo mismo para el 73% de los casos con pérdida de uno de los alelos.

La proteína p16, producto del gen CDKN2A, participa en el ciclo celular. Hay distintas causas de inactivación del gen. Lo más frecuente es la deleción homocigota. Las mutaciones son raras. Otros mecanismos epigenéticos (metilación) se han descrito. Cualquier forma de inactivación del gen lleva a una pérdida de expresión de la proteína p16.

Sin embargo, en este estudio no hay una correlación significativa, lo que sugiere la intervención de otros mecanismos distintos. Se ha apuntado un posible papel colaborador entre p53 y p16 en la carcinogénesis del cáncer de urotelio.

Analizando por separado los siete casos que recidivaron con progresión se observa una correlación positiva en la deleción 9p21 entre primarios y recidivas que puede indicar que se trata de un evento temprano que se perpetúa en ellos. Así mismo, hay correlación lineal entre p53 y p16 en cada caso, tal vez por el papel colaborador que se les ha atribuido.

En cuanto al significado de las anomalías cromosómicas en el carcinoma urotelial, la deleción de 9p21 se ha relacionado con carcinomas recidivantes, habiéndose referido cifras del 90%, si bien algunos estudiaban otras regiones distintas del cr. 9. Nuestros resultados (77%) indican que, aunque la pérdida de esta región es de gran interés, usada aisladamente podría no detectar muchos casos. Por tanto, es recomendable su uso junto con el resto de sondas. Como hemos podido ver en este estudio, un 90% de los tumores sí muestran alguna alteración, aneuploidía o deleción.

	Aneusomía 3,7,17	Eusomía	Aneusomía 2 cr	>Delección 9p21	No delección	Aneus y/o del	p53 +	p53 -	p16 +	p16 -
Tumores bajo grado (n=126)	53(42%)	73(58%)	37(29%)	90(71%)	36(29%)	110(87%)	79(63%)	46(37%)	43(34%)	82(66%)
Tumores alto grado (n=53)	41(77%)	12(23%)	34(64%)	32(60%)	21(40%)	48(91%)	33(63%)	19(37%)	16(31%)	36(69%)
Tumores primarios (n=83)	52(63%)	31(37%)		59(71%)	24(29%)	73(88%)				
Recidivas (n=96)	63(66%)	33(34%)		63(66%)	33(34%)	85(89%)				
Primarios con progresión	5	2		5	2		3	3	3	3
Recidivas con progresión	5	2		5	2		4	2	2	4

n= 29	Tumor + (biopsia)	%	Tumor - (cistoscopia y/o biopsia)	%
Test + (n=10)	8	80%	2	20%
Test - (n=16)	3	19%	13	81%
Test no informativo			2	
Diagnosticado por FISH	8	73%	13	87%
Diagnosticado por citología	7	64%	9	60%
No diagnosticado por FISH	3	27%	2	13%
No diagnosticado por citología	4	36%	4	27%

Lo que no se ha podido demostrar es que alguno de estos parámetros pueda tener un valor predictivo de la evolución del tumor. Un 22% no mostró alteraciones y sin embargo recidivaron. Lo mismo ocurre con la expresión de p53: un 37% fueron negativos.

Para estudiar la eficacia del test en cáncer urotelial se han desarrollado estudios analizando comparativamente los resultados de citología y FISH, concluyendo que la FISH tiene mayor sensibilidad y similar especificidad. En nuestro estudio se abordó este aspecto en la parte prospectiva del trabajo. Se diagnosticaron por FISH el 73% de los carcinomas uroteliales, mientras que la citología urinaria detectó un 64% de los mismos. Los casos negativos fueron diagnosticados en un 87% por FISH frente al 60% de la citología. Los tres falsos negativos por FISH correspondieron en las biopsias posteriores a dos displasias de bajo grado y a un carcinoma pobremente diferenciado. De los ensayos positivos, en dos no se ha confirmado hasta el momento la presencia de recidiva. La evolución posterior de los casos podrá confirmar o no el posible "efecto anticipatorio" del test. Creemos que, más que un valor predictivo, lo que puede indicar el hallazgo de alteraciones por FISH es la presencia de neoplasia no detectable por cistoscopia ni citología o biopsia.

No se conoce si las alteraciones cromosómicas que se detectan por este método reflejan la existencia de una neoplasia o un estado de inestabilidad del urotelio que propicia el que se desarrolle ésta. En todos los trabajos se detectan casos que cumplen los criterios de positividad para FISH en los que no se observa tumor en la cistoscopia y biopsia inmediata. También ha habido casos con neoplasia probada por biopsia en la que la FISH no

ha detectado alteraciones. Esto impide que este método de detección pueda aplicarse aisladamente, pero creemos que es una herramienta válida como complemento de la cistoscopia y la citología de orina y que el uso conjunto de las tres puede suponer una mejora en el diagnóstico y seguimiento del carcinoma de urotelio y, por consiguiente, un beneficio para el paciente.

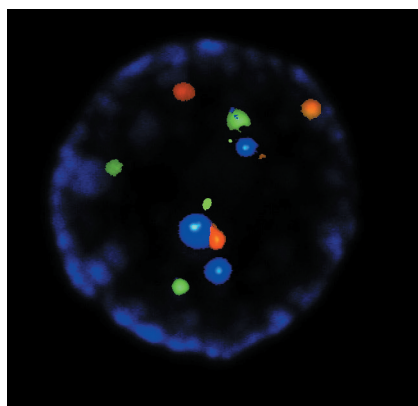


Figura 1. Célula urotelial con polisomía de los cr 7 (SpectrumRed) y 17 (SpectrumAqua). Dotación normal de cr 3 (SpectrumGreen) y 9p21(SpectrumGold). (x100).

La hiperhomocisteinemia como factor de riesgo cardiovascular tras el trasplante renal

P. Errasti, J. Manrique

Clínica Universitaria Navarra. Servicio de Nefrología. Pamplona.

OBJETIVOS

El objetivo principal del proyecto es demostrar que la normalización de los niveles plasmáticos de homocisteína que se consiguen con tratamiento con suplementos vitamínicos (ácido fólico y vitamina B12) se acompañan de mejoría de parámetros de disfunción endotelial, inflamación, factores procoagulantes y estrés oxidativo. La determinación de estos parámetros se han realizado con la medición de marcadores séricos, plasmáticos y urinarios, así como mediante la realización de Ecografía Doppler braquial (valoración

de la capacidad de dilatación endotelial a nivel de arteria braquial). Las determinaciones se realizaron en una visita basal y pasados tres meses.

Se comparan tres grupos de pacientes, trasplantes renales con homocisteína normal (<14mmol/L), trasplantes con homocisteína alta (>14mmol/L) que no reciben tratamiento y trasplantes con homocisteína alta que tratamos con la terapia indicada.

Todos los pacientes dan su consentimiento informado por escrito y se les da una hoja de información al paciente.

Monitorización de la respuesta inducida en donantes y en pacientes con mieloma múltiple tras el procedimiento terapéutico consistente en vacunación idiotípica del donante seguido de minialotrasplante de progenitores hematopoyéticos y vacunación idiotípica del paciente

S. Inogés

Área de Terapia Celular. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia caracterizada por la producción de una inmunoglobulina monoclonal tumor-específica que es posible emplear como diana inmunológica en el contexto de la denominada vacunación idiotípica. A pesar de regímenes quimioterápicos agresivos, el curso clínico del MM se caracteriza por la progresión de la enfermedad. La única terapia que hasta el momento ha producido respuestas completas, o incluso curativas, ha sido el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH). Con el fin de reducir la elevada toxicidad del trasplante alogénico convencional, manteniendo el efecto injerto contra mieloma, se han desarrollado protocolos de TAPH empleando un acondicionamiento no mioablativo (minialotrasplante).

Por otra parte, el mieloma tiene una característica biológica que es la presencia de antígenos tumorales específicos de tumor (el idiotipo tumoral y los fragmentos peptídicos derivados de él). Estos antígenos pueden ser utilizados como diana del sistema inmune y por tanto, la inmunoterapia puede ser un complemento terapéutico útil para el control de las recaídas de la enfermedad. En este sentido, el empleo de vacu-

na idiotípica en el tratamiento del MM y de otras neoplasias B, como el linfoma folicular, esta ampliamente descrito en la literatura. El Dr. Bendandi (Director de Laboratorio de Inmunoterapia en el que se ha llevado a cabo este proyecto) ha sido pionero junto a Larry Kwak en el desarrollo de la vacunación idiotípica en pacientes con LNH y MM en el National Cancer Institute (NCI) de EEUU.

Nuestro centro está actualmente coordinando un ensayo clínico multicéntrico que emplea de manera combinada la vacunación idiotípica (de donante y paciente) y el minialotrasplante en pacientes con MM. Con este ensayo clínico se pretende inducir, mediante la vacunación idiotípica, una respuesta inmune humoral y/o celular en los donantes de progenitores hematopoyéticos, que luego se intentará transferir a los pacientes mediante el trasplante. La respuesta inmune se intentará mantener en los pacientes mediante su vacunación periódica después del trasplante.

En el contexto de este estudio, resulta crucial estudiar detalladamente la respuesta inmune inducida tras la vacunación. Se estudia tanto la respuesta celular, mediante la determinación de la secreción de citoquinas

(ELISA / ELISPOT de TNF- α e IFN- γ), estudios de citotoxicidad (con métodos radioactivos) y estudios de proliferación (con métodos radioactivos), siempre en respuesta al antígeno tumoral (idiotipo) como la respuesta humoral (determinación de la presencia de anticuerpos anti-idiotipo mediante ELISA). También se estudia la respuesta humoral y celular frente a KLH. Para estas determinaciones, tanto en el donante como en el paciente se extrae sangre antes de cada vacuna de forma que se compara la respuesta de cada dosis con la situación basal previa a la vacunación (muestra extraída antes de la primera vacuna).

Aunque en principio se pretendían incluir 30 parejas donante/paciente, finalmente sólo ha sido posible incluir 9. En todas ellas se ha completado la vacunación del donante, pero debido al curso natural de esta enfermedad, sólo va a ser posible vacunar a dos pacientes: uno de ellos ha recibido ya ocho vacunas y le quedan cuatro para completar el número total de dosis y el otro comenzará en breve el calendario vacunal.

Nuestros resultados señalan en primer lugar en cuanto a los donantes, que el tratamiento no tiene

ningún efecto secundario. Además demuestran que aunque en algún caso se ha conseguido inducir una discreta respuesta idiotipo específica, la estrategia diseñada no es suficiente para generar una respuesta inmune eficaz, por lo que se debería plantear diseñar una estrategia capaz de inducir una respuesta inmune más potente, bien sea aumentando el número de dosis de vacuna o bien incluyendo en la formulación de la vacuna un adyuvante, como por ejemplo GM-CSF. En cuanto a los pacientes, no podemos sacar ninguna conclusión, sólo señalar que el único paciente que hemos vacunado permanece sin enfermedad más de dos años después del trasplante. En este momento el paciente ha recibido ocho dosis de vacuna y aún le quedan por recibir cuatro vacunas trimestrales antes de completar el calendario vacunal. No ha tenido ningún efecto adverso como consecuencia de la vacunación. Los demás pacientes, excepto uno que está a punto de empezar las vacunaciones, han progresado antes de poder iniciar el calendario vacunal o han muerto como consecuencia de complicaciones post-trasplante.

Estudio de incidencia de la enfermedad cerebrovascular aguda en la comarca de Pamplona

E. Martínez, J. Gállego, F. Guillén, J. Muruzábal, G. Delgado, J.A. Villanueva, J.M. Manubens, B. Bermejo, F. Zubiri, F. Lacruz, J. Masdeu, A. Pereda, J. Rocafort

Servicio de Neurología. Hospital de Navarra. Pamplona.

Departamento de Neurología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

FUNDAMENTOS

La enfermedad cerebrovascular aguda (ECVA) es la primera causa de mortalidad en la mujer y la tercera en el varón en Navarra. Es uno de los principales motivos de discapacidad en los adultos y supone un gasto sociosanitario muy elevado al año. El envejecimiento progresivo de la población en los países desarrollados hace prever un incremento en la incidencia de ECVA en los próximos años. Las cifras de incidencia de ictus oscilan entre 140-280 casos por 100.000 hab/año. Para poder comparar estudios a nivel internacional es necesario cumplir una serie de requisitos establecidos por Sudlow y Warlow hace años y revisados recientemente (2005). Actualmente, ni en Navarra ni en España existen estudios de incidencia que reúnan estas características. El fácil acceso a los medios sanitarios tanto públicos como privados de la población de Pamplona y Barañain permite realizar un estudio epidemiológico para conocer en profundidad el estado de la ECVA en nuestra Comunidad Foral. Los objetivos de nuestro estudio son conocer la incidencia de ECVA y de los distintos subtipos de infarto cerebral según criterios

TOAST en población mayor de 20 años de Pamplona y Barañain, analizar la mortalidad y factores de riesgo vascular (FRV) asociados y la recurrencia en un año de los casos incidentes en el primer año con sus FRV asociados.

MATERIAL Y METODOS

Se ha considerado la definición de ictus de OMS. Se han recogido todos los casos incidentes desde noviembre del 2003 hasta noviembre del 2005. Para ello se han empleado diversas fuentes de información intra y extrahospitalarias. El denominador para el cálculo de la incidencia se ha obtenido de datos del censo revisados a 1 de enero de 2005. Se han introducido todos los datos en una base informática anónima para su posterior análisis estadístico.

RESULTADOS

Se han detectado 616 casos de una población de 175.734 habitantes, con una edad media de 73,95 años y una distribución entre hombres y mujeres similar. La incidencia de ictus en población mayor de 18 años es de

174,9 (161,7-189,3) casos por 100.000 hab/año (Tabla 1). El subtipo de ictus más frecuente ha sido el infarto cardioembólico con una incidencia de 43,2 (36,8-50,6) seguido del lacunar 34,6 (29-41,4) y aterotrombótico 13,6 (10,3-18,1) (Fig. 1). La mortalidad al mes se sitúa en el 14,9% de los casos asociada principalmente al infarto cardioembólico. Destaca el buen pronóstico del infarto lacunar con una mortalidad del 0%. El principal FRV para todos los subtipos de ictus es la HTA. Destaca la fibrilación auricular como FRV para el infarto cardioembólico, diabetes e HTA para el ictus lacunar e hipercolesterolemia para el aterotrombótico. La recurrencia el pri-

mer año se sitúa en el 2,4% de los casos y es más frecuente en mujeres y en el ictus cardioembólico.

CONCLUSIONES

Las cifras de incidencia son similares a las obtenidas en otros estudios en países desarrollados. La mortalidad en la fase aguda del ictus es algo menor. Existen muy pocos estudios poblacionales que analicen los subtipos de ictus isquémico, nuestros resultados son similares al último publicado. El principal interés de este trabajo es sentar las bases para nuevos estudios epidemiológicos de tendencias de incidencia y mortalidad de la ECVA en nuestra comunidad.

Tabla 1. Incidencias por edades y sexo.

Grupo de edad	Varón					Mujer					Total				
	Casos	Persona x tiempo	Tasa de Incidencia (100.000)	IC95%		Casos	Persona x tiempo	Tasa de Incidencia (100.000)	IC95%		Casos	Persona x tiempo	Tasa de Incidencia (100.000)	IC95%	
				Lim. Inf.	Lim. Sup.				Lim. Inf.	Lim. Sup.				Lim. Inf.	Lim. Sup.
20-24	0	14326	0,0			1	14206	7,0	1,0	50,0	1	28532	3,5	0,5	24,9
25-34	4	38408	10,4	3,9	27,7	2	36876	5,4	1,4	21,7	6	75284	8,0	3,6	17,7
35-44	13	34032	38,2	22,2	65,8	5	34070	14,7	6,1	35,3	18	68102	26,4	16,7	42,0
45-54	21	26942	77,9	50,8	119,5	11	30258	36,4	20,1	65,6	32	57200	55,9	39,6	79,1
55-64	51	23864	213,7	162,4	281,2	24	26624	90,1	60,4	134,5	75	50488	148,6	118,5	186,3
65-74	90	16322	551,4	448,5	677,9	38	20494	185,4	134,9	254,8	128	36816	347,7	292,4	413,4
75-84	82	9958	823,5	663,2	1022,5	130	16194	802,8	676,0	953,3	212	26152	810,6	708,5	927,5
>=85	52	2566	2026,5	1544,2	2659,4	92	6984	1317,3	1073,8	1616,0	144	9550	1507,9	1280,6	1775,4
Total	313	166418	188,1	168,4	210,1	303	185706	163,2	145,8	182,6	616	352124	174,9	161,7	189,3

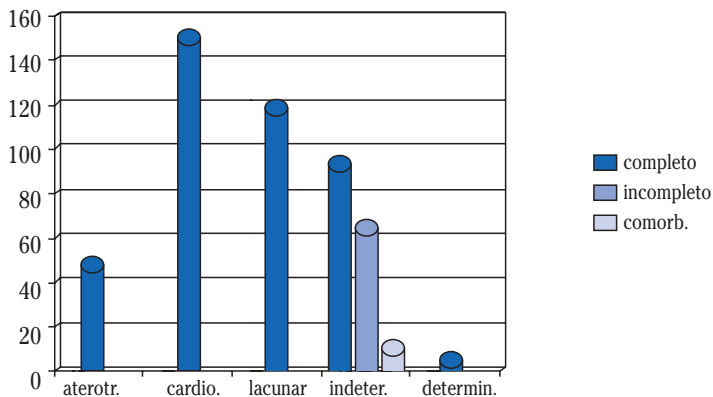


Figura 1. Subtipos de infarto cerebral según la clasificación TOAST.

Inactivación epigenética de RASSF1A, NORE1A y BLU, y su correlación con alteraciones genéticas típicas, en neuroblastoma: los efectores de Ras como posible nueva vía de tratamiento del neuroblastoma

P. Lázcoz¹, I. Encío¹, J. Sáez²

1. Universidad Pública de Navarra. Pamplona.

2. Universidad de Navarra. Pamplona.

FUNDAMENTO

Los tumores neuroblásticos son los tumores sólidos extracraneales más frecuentes durante los dos primeros años de vida. Se localizan en la médula adrenal y ganglios del sistema nervioso simpático. Las lesiones genéticas típicas de estos tumores son la amplificación de MYCN, la delección de 1p, 11q y 14q.

RASSF1, efector de Ras, se localiza en 3p21.3, locus que sufre frecuentemente LOH en tumores de pulmón y mama, entre otros. RASSF1 tiene tres transcritos mayores (A, B y C). Se ha observado que RASSF1A presenta hipermetilación aberrante en un porcentaje significativo de carcinomas como son por ejemplo los de mama, ovario y próstata.

El gen NORE1 humano, situado en 1q32.1, ha sido recientemente descrito como efector de Ras. Presenta tres isoformas (A, B y C) de las cuales NORE1A sufre hipermetilación en líneas celulares tumorales de pulmón, mama, colon y riñón. Se ha demostrado que RASSF1A homodimeriza y heterodimeriza con Nore1 a través de su segmento aminoterminal no homólogo, y no se une a Ras directamente.

El gen BLU se sitúa en 3p21.3, al igual que RASSF1. De hecho, ese locus sufre frecuentemente LOH y delecciones homocigóticas en cáncer de pulmón. Existen dos isoformas de BLU, la isoforma de pulmón (12 exones) y la isoforma de testículo (11 exones). BLU comparte un 30% de homología con proteínas de la familia

de factores de transcripción MTG/ETO y las supresinas, que se supone regulan la entrada al ciclo celular.

El gen CASP8 se localiza en 2q33-q34 y codifica una cistein-proteasa implicada en la apoptosis. Se ha observado que este gen sufre delecciones e hipermetilación asociada a la amplificación de MYCN en neuroblastomas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Se dispuso de 41 DNAs extraídos de tumores neuroblásticos. Asimismo se estudiaron 12 líneas celulares de neuroblastoma. Se utilizaron DNAs extraídos de sangre periférica de donantes sanos como controles negativos de metilación. La línea celular SW48 de carcinoma de colon fue utilizada como control positivo de metilación de los genes RASSF1A y NORE1A. En el caso de BLU y CASP8 se utilizó un DNA metilado "in vitro" (CpGenomeTM Universal Methylated DNA, Chemicon) como control positivo de metilación.

Metodología

Modificación con bisulfito. Se trataron tanto las muestras como los controles con bisulfito según el "CpGenomeTM DNA Modification Kit" (Chemicon), de modo que las citosinas no metiladas presentes en el DNA son convertidas en uracilos.

Tabla 1. Hipermetilación de RASSF1A, NORE1A BLU y CASP8 en tumores neuroblásticos y líneas celulares de neuroblastoma.

Tumores	RASSF1A	NORE1A	BLU	CASP 8
Nº total tumores analizados	41	41	41	41
No amplificados	6	7	6	6
No metilados (-)	6	33	32	14
Metilados (+)	29 (83%)	1 (3%)	3 (8%)	21 (60%)
Línea Celular	RASSF1A	NORE1A	BLU	CASP 8
Kelly	(+)	(+)	(+)	(+)
SIMA	(+)	(-)	(+)	(+)
MC-IXC	(+)	(-)	(-)	(+)
SK-N-FI	(+)	(-)	(-)	(+)
SH-SY-5Y	(+)	(-)	(+)	(+)
SK-H-SH	(+)	(-)	(+)	(+)
SK-Y-MC	(+)	(+)	(-)	(-)
IMR 32	(+)	(+)	(+)	(+)
MHH-NB-11	(+)	(+)	(+)	(+)
SK-N-Be(2)	(+)	(-)	(-)	(+)
SK-N-DZ	(+)	(+)	(+)	(+)
Be(2)C	(+)	(+)	(-)	(+)

MSP (Methylation Sensitive PCR). Los DNAs tras el tratamiento con bisulfito fueron sometidos a dos reacciones de PCR utilizando dos parejas de cebadores específicos de cada gen: una de ellas diseñada bajo la premisa de que no hubiera metilación a nivel del promotor y la otra suponiendo que sí la había.

Expresión de los genes en líneas celulares mediante RT-PCR.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos tanto en los tumores como en las líneas celulares se resumen en la tabla 1 y la figura 1.

CONCLUSIONES

- La inactivación de RASSF1A por metilación podría constituir una nueva vía de tumorigénesis en neuroblastomas.
- La metilación de NORE1A no parece ser un fenómeno frecuente en la génesis de estos tumores.
- La metilación del gen BLU localizado en el cromosoma 3p21.3 (al igual que RASSF1A) no parece estar asociada a la metilación de RASSF1A.
- La metilación del gen CASP8 parece estar asociarse al desarrollo del neuroblastoma.

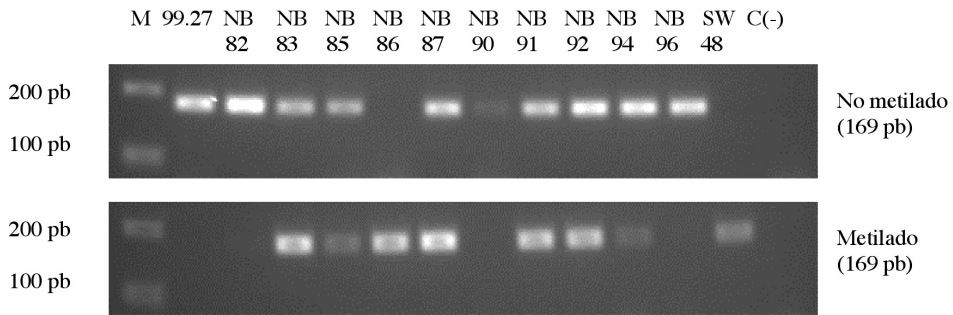


Figura 1. Metilación de RASSF1A en tumores neuroblásticos.

Geles de agarosa al 2,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 g/ml). La primera muestra (99,27) corresponde a DNA genómico extraído de sangre periférica de un donante sano (control negativo de metilación), seguida de 10 neuroblastomas, la línea celular SW48 (control positivo de metilación de RASSF1A) y un control negativo de PCR. Se utilizó un marcador de peso molecular (*1Kb Plus Ladder, Invitrogen*) para determinar el tamaño de las bandas.

Efecto de la terapia de resincronización cardiaca sobre un marcador bioquímico de fibrosis miocárdica en pacientes con insuficiencia cardiaca avanzada

I. García-Bolao¹, A. Macías¹, B. López², A. González², J. Gavira¹, P. Azcárate¹, E. Alegría¹, J. Díez¹

1. Departamento de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Clínica Universitaria de Navarra. Facultad de Medicina. Pamplona.
2. Área de Ciencias Cardiovasculares. Centro para la Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra. Pamplona. Navarra.

FUNDAMENTO

La terapia de resincronización cardiaca (TRC) es un tratamiento eficaz para la insuficiencia cardiaca refractaria (IC). Sin embargo su mecanismo de actuación todavía no es del todo conocido y hasta un 30% de los pacientes no responden a la TRC.

OBJETIVO

Hemos investigado si los niveles séricos del péptido carboxy-terminal del procolágeno tipo I (PICP), un marcador de la síntesis y el depósito miocárdico de colágeno tipo I, están relacionados con la respuesta a largo plazo a la TRC.

MÉTODOS

El estudio fue llevado a cabo en 38 pacientes con IC con indicación de TRC a los que se le implantó con éxito. La evaluación clínica y ecocardiográfica, así como la determinación sérica de PICP, se realizaron antes de la implantación del dispositivo y un año después.

RESULTADOS

Veintiséis pacientes (68%) fueron respondedores

a la TRC y 12 (32%) no respondedores. Los niveles basales de PICP séricos fueron mayores ($P < 0,001$) en los respondedores que en los no respondedores y en los controles. Después de un año de seguimiento, los niveles séricos de PICP disminuyeron ($P < 0,001$) en los respondedores y aumentaron en los no respondedores ($P < 0,005$). Utilizando curvas ROC (*receiver operating characteristic curves*), observamos que un valor de corte de 73 mg/L de PICP sérico tiene una especificidad del 83% y una sensibilidad del 85% para predecir una respuesta positiva a TRC con una *odds ratio* de 27,5 (IC 95% 4,3 a 175,7, $P < 0,001$).

CONCLUSIONES

Estos hallazgos sugieren que una disminución en la síntesis y depósito miocárdico excesivo de colágeno tipo I puede ser uno de los mecanismos que contribuyen en los efectos beneficiosos a largo plazo de la TRC en pacientes con IC. Además el nivel de PICP sérico puede ser un buen predictor de respuesta a la TRC en estos pacientes.

Tabla 1. Capacidad global de los distintos parámetros para predecir una respuesta favorable a la TRC de acuerdo con la curvas ROC

Parámetros	Valor de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Odds ratio (95% IC)
PICP	73 µg/L	85	83 (4,3-175,7)	27,5
NT-proBNP	815 pg/mL	71	49	0.750 (0,15-3,62)
DTD	67,5 mm	75	61.5	5.6 (1,2-26,3)
RSPL	95 ms	67	40	0.333 (0,067-1,65)

PICP própeptido carboxy-terminal del procolágeno tipo I; NT-proBNP, própeptido amino-terminal del péptido natriurético cerebral; DTD, diámetro telediastólico; RSPL, restraso septo-pared lateal; IC, intervalo de confianza

Análisis de polimorfismos de genes candidatos para aterotrombosis en pacientes con infarto agudo de miocardio e ictus

M. J. Paloma

Servicio de Hematología. Hospital Virgen del Camino. Pamplona.

FUNDAMENTO

La aterotrombosis, sustrato fisiopatológico del ictus e infarto agudo de miocardio (IAM), es una enfermedad poligénica y multifactorial, resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Mientras que los factores tradicionales de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, hipercolesterolemia, tabaquismo y diabetes mellitus) son responsables de un 50% de los episodios trombóticos, un porcentaje importante de pacientes con ictus e IAM no presentan ninguno de dichos factores, lo que sugiere la importancia del componente genético. Por ello, diversos estudios han analizado la presencia de polimorfismos, cambios en la secuencia de un gen, en genes candidatos para el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, en la mayoría de los casos no se ha podido establecer la implicación real de polimorfismos aislados.

El análisis conjunto de polimorfismos en múltiples genes puede permitir una aproximación más real y definir con precisión la propensión para un determinado fenotipo aterotrombótico. Por otra parte, si bien el efecto de los polimorfismos sobre la incidencia de trombosis en enfermedades complejas, como el ictus de IAM puede ser modesto, su importancia es mayor si se consideran simultáneamente los factores ambientales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se contactó con los servicios de Neurología y Cardiología para la captación de pacientes menores de 60 años que hubieran sufrido un ictus o IAM y que en el momento de la recogida de las muestras de sangre hubiese transcurrido al menos un mes y no más de doce meses.

Los pacientes que accedieron a participar en el estudio fueron citados en la consulta de hematología y tras la firma del consentimiento informado, se recogieron los siguientes datos de cada paciente: tipo de evento (IAM o ictus), fecha del evento, sexo, edad, peso, talla, hábito tabáquico, antecedentes familiares de IAM y ACV, antecedentes personales de HTA, hiperlipemia, diabetes mellitus, tratamiento antes y después del evento, tratamiento hormonal sustitutivo en el caso de las mujeres y microalbuminuria.

Como grupo control se extrajeron muestras de EDTA y posteriormente el DNA de personas menores de 60 años con factores de riesgo vascular que no hubieran padecido IAM ni ictus.

En el estudio participaron 169 pacientes, 65 con ictus, 102 con IAM y 78 controles. Se extrajeron las muestras de sangre: 2 tubos de EDTA, 1 tubo de suero y 1 tubo de plasma citratado. El plasma y el suero fue-

ron congelados a -80°C para una posterior determinación de proteína C reactiva y factor von Willebrand antigénico. Con los tubos de EDTA de cada paciente se procedió a la extracción del DNA y determinación de los polimorfismos genéticos mediante un kit CVD stripAssay (Izasa).

RESULTADOS

Las características demográficas y de los factores de riesgo vascular se muestran en la tabla 1. En el estudio participaron 78 controles (edad media 52 años), 65 pacientes con ictus (edad media: 51,7) y 102 con IAM (edad media: 51,3), la mayoría eran hombres. En cuanto al índice de masa corporal hubo diferencias significativas entre los controles y los pacientes con ictus ($p=0,01$) pero no entre los controles y pacientes con IAM. Entre los factores de riesgo vascular se observaron diferencias significativas en la frecuencia de pacientes diabéticos con ictus ($p=0,001$) y con IAMA ($p=0,01$) en relación a los sujetos controles pero no en cuanto al consumo de tabaco o pacientes con HTA. Además hubo diferencias respecto al grupo control en los niveles de LDL-colesterol ($p=0,004$) y triglicéridos ($p<0,001$) de los pacientes con ictus pero no en los niveles de colesterol y HDL-colesterol. En los pacientes con IAM los niveles de colesterol ($p=0,001$), HDL-colesterol ($p<0,001$), LDL-colesterol ($p<0,001$), y triglicéridos ($p<0,001$) estaban significativamente reducidos.

La frecuencia de antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular fue mayor en los pacientes con ictus ($p=0,005$) e IAM ($p<0,001$) que en los sujetos control.

Los niveles de fibrinógeno tras el evento fueron más elevados en el grupo de pacientes con ictus ($p<0,001$) e IAM ($p<0,001$) que en el grupo control y no hubo diferencias en los niveles de proteína C reactiva tras el evento en ambos grupos.

No se observaron diferencias significativas en los siguientes polimorfismos genéticos. FV R506Q (Leiden), FV H1299R (R2), Mutación G20210A de la protrombina, Factor XIII (V34L), Fibrinógeno (-455 G7A), MTHFR C677T MTHFR 1298C, ACE (del/ins) y Apo E (E2, E3, E4), entre los sujetos con ictus e IAM en relación al grupo control. No se observaron polimorfismos del gen APO B. En nuestro estudio se observaron diferencias significativas para los polimorfismos PAI-1 4G/5G y GP IIIa L33P (HPA-1) en ambos eventos.

Se observó una mayor prevalencia del alelo 4G en los sujetos con ictus e IAM respecto al grupo control.

En cuanto al polimorfismo HPA-1 no se observaron diferencias significativas respecto al alelo 1b pero sí

una mayor prevalencia de la forma heterocigoto tanto en ictus como en IAM.

CONCLUSIONES

En la serie analizada existió una asociación estadísticamente significativa del polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1 en los pacientes con ictus e IAM con diferencias en la frecuencia del alelo 4G que fue más prevalente. Diversos estudios han demostrado que concentraciones elevadas de PAI-1 están asociadas con un

mayor riesgo de trombosis tanto arterial como venosa. Los sujetos con el alelo 4G presentan concentraciones más elevadas de PAI-1.

El genotipo 1a1b presenta unas características fisiológicas similares al genotipo 1a1a, por lo que su frecuencia aumentada en ambos eventos no condiciona el desarrollo de los mismos.

El resto de polimorfismos genéticos clásicamente relacionados con trombosis venosa no se asociaron a trombosis arterial.

Tabla 1. Características demográficas, factores de riesgo vascular y marcadores inflamatorios.

	CONTROL 78	ICTUS 65	IAM 102	P ICTUS	P IAM
EDAD	52±8	51,7±6,8	51,3±6,5	ns	ns
SEXO (M/F)	57/17	43/22	87/15	ns	ns
ICM	27,7±3,9	26,4±4,4	27,7±3,4	0,015	ns
HTA	44,6%	55,4%	46,1%	ns	ns
DIABET	3,8%	21,5%	15,7%	0,001	0,01
T-ABAC	39,2%	53,8%	53,9%	ns	ns
COLEST	225,9±43,3	219,1±46	203,6±53	ns	0,001
HDL-C	49,5±11,9	46,6±14,4	40,5±12	ns	<0,001
LDL-C	153±41,8	133±32,1	130±33,5	0,004	<0,001
TRIGLIC	123,3±68,1	164±71,1	204±299,3	<0,001	<0,001
AF IAM	18,7%	41,5%	53,9%	0,005	<0,001
FIBRINOG	286,4±74,5	342,6±60,7	353,9±72	<0,001	<0,001
PCR	0,3±0,5	0,4±0,4	0,3±0,4	ns	ns

Estudio de la expresión de la subunidad R2 de la ribonucleótido reductasa inductible por TP53 y de la CHK2 en relación con la respuesta a radioterapia en carcinoma de laringe

F. Arias de la Vega

Hospital de Navarra. Pamplona.

Los pacientes con carcinomas localmente avanzados de cabeza y cuello constituyen un grupo de mal pronóstico, con menos del 30% de pacientes supervivientes a los cinco años del tratamiento. La utilización simultánea de radioterapia hiperfraccionada con "Boost Concomitante" y cisplatino ofrece, en los ensayos publicados en la literatura, una mayor tasa de respuestas en estos pacientes. Basado en las consideraciones anteriores, el Servicio de Oncología del Hospital de Navarra comenzó en el 2002 un protocolo de tratamiento con radioterapia hiperfraccionada y acelerada con "Boost Concomitante" y cisplatino concurrente en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello localmente avanzados.

Aunque los factores clínicos pronósticos que condicionan la respuesta tumoral al tratamiento oncológico están suficientemente estudiados, no ocurre lo mismo con los factores moleculares. Existen diversos marcadores² en la capacidad de respuesta al tratamiento instaurado(2).

En este estudio hemos analizado en las muestras de biopsia diagnóstica de pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello la expresión, a nivel de ARN mensajero, de los factores p53R2 y CHK2 en relación con la respuesta a la radioterapia hiperfraccionada con "Boost Concomitante". También se ha analizado la respuesta tumoral y la supervivencia tras el tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras. Se recogieron muestras de biopsia diagnóstica de pacientes diagnosticados de cáncer de cabeza y cuello en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Virgen del Camino previo consentimiento informado. Se recogieron en total 22 muestras pertenecientes a 2 mujeres y 20 hombres.

Extracción de ARN total. Para la extracción de ARN de tejido tumoral empleamos el reactivo TRIzol[®] (Invitrogen). A continuación purificamos el ARN con el Kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) Para medir la cantidad de ARN extraído de cada muestra se empleó el espectrómetro "NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis" (NanoDrop Technologies, Inc.). Se procedió a guardar e ARN extraído hasta su utilización a -80 grados centígrados precipitando con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 molar pH=5,2 Síntesis de ADN complementario.

Síntesis de ADN complementario. El protocolo de retrotranscripción seguido fue el propuesto por la casa comercial Applied Biosystems empleando los reactivos especificados por la misma para ese fin.

Cuantificación de la expresión mediante PCR en tiempo real.

RESULTADOS

La localización primaria del tumor y la clasificación del estadio del los pacientes según el criterio de la AJC no presenta asociación estadística significativa ni con la respuesta desarrollada ($P = 0,324$, $P = 0,89$), ni con el desarrollo de recidivas locales ($P = 0,392$, $P = 0,382$) ni con el estatus actual de los pacientes ($P = 0,695$, $P = 0,793$).

Sin embargo si aparece una asociación estadísticamente muy significativa ($P < 0,001$) entre la aparición de recidiva local y una mayor expresión del ARN mensajero del factor CHK2. La media del ratio de expresión de CHK2 para los pacientes que presentan recidiva fue de 2,12 y para los pacientes sin recidiva 0,66

El seguimiento de la supervivencia de los pacientes incluidos en este seguimiento arroja los siguientes resultados: la mediana de supervivencia de los pacientes que desarrollaron una respuesta completa o parcial es de 22,93 meses (IC95%: 19,42-26,43) frente a los pacientes que no respondieron al tratamiento cuya mediana de supervivencia es de 17,68 meses.

En análisis de la supervivencia comparando la respuesta completa frente a todos los demás tipos de respuesta no pudo alcanzarse la mediana en el grupo de pacientes con respuesta completa. En este grupo más del 50% de los pacientes continuaba con vida al final del periodo de seguimiento. Por el contrario los pacientes que tan sólo presentaban respuesta parcial tienen una media de supervivencia de 14,93 meses (IC95%: 4,04-25,82).

CONCLUSIONES

El tratamiento con radioterapia hiperfraccionada y acelerada con "Boost Concomitante" y cisplatino concurrente busca reducir la tasa de metástasis a distancia y de recidivas locales. La presencia de recidiva local puede responder a un fallo del tratamiento radioterápico. Al comienzo del estudio se postulaba como hipótesis que el fracaso a podría estar relacionado con una mayor actividad de los mecanismos de reparación genéticos.

A pesar del limitado tamaño muestral los resultados obtenidos muestran una clara relación entre el aumento de expresión de CHK2 y la aparición de recidivas locales. CHK2 parece portar un papel en la actuación y control de la reparación del ADN. Constituye uno de los primeros sensores moleculares activados por el sistema ATM/ATR en respuesta al daño genético. Así mismo, es capaz de regular tanto el ciclo celular, a través de Cdc25 y de TP53, como la reparación del ADN a través también de TP53 y del factor BRCA1 entre otros.

Los datos alcanzados en este estudio sugieren un posible papel del CHK2 en la predicción de recidivas post-radioterapia. Sería conveniente incrementar el tamaño muestral hasta que permita validar los resultados obtenidos.

La asociación entre el nivel de colaboración interprofesional en las unidades de hospitalización de oncología y los resultados en los pacientes y en los profesionales

L. San Martín, D. D'Amour, C. Oroviogicochea, M. Leduc, J.L. Pérez

FUNDAMENTO

La formación de equipos interprofesionales que trabajan en colaboración se ha convertido en base fundamental de la organización del trabajo en los hospitales. Del desarrollo de la colaboración entre los profesionales de la salud se esperan resultados positivos, tanto para los pacientes, como para los profesionales miembros de los equipos. El objetivo de este estudio es evaluar los efectos de la colaboración interprofesional sobre los pacientes hospitalizados en las unidades de oncología (satisfacción, incertidumbre con respecto a su enfermedad, hospitalización y tratamiento, adecuación de la gestión del dolor y estancia hospitalaria) y sobre los profesionales que forman parte de esos equipos (satisfacción en el trabajo y compromiso con la organización).

MATERIAL Y MÉTODOS

La evaluación de los efectos en los profesionales se ha realizado mediante un diseño correlacional, mientras que la evaluación de los efectos en los pacientes se ha realizado mediante un diseño comparativo o «natural experiment». La muestra la han formado 41 profesionales (médicos, residentes y enfermeras) y de 312 pacientes, pertenecientes a 4 equipos de oncología y hematología de un centro hospitalario de la Comunidad Foral. El análisis de datos se ha realizado

con ayuda de modelos de regresión lineal múltiple y modelos ANOVA y ANCOVA.

RESULTADOS

Los resultados indican que la intensidad de la colaboración interprofesional tiene un efecto positivo sobre la satisfacción de los profesionales en el trabajo ($b = 0,572$; $p < 0,001$), así como sobre la satisfacción de los pacientes ($F = 21,254$; $p < 0,001$), el nivel de incertidumbre del paciente ($F = 3,985$; $p = 0,047$) y la adecuación de la gestión del dolor del paciente ($F = 5,912$; $p = 0,016$). Los resultados indican también que la intensidad de la colaboración interprofesional no tiene efectos ni sobre el compromiso de los profesionales con la organización ($p = 0,086$), ni sobre la estancia del paciente en el hospital ($t = 1,535$; $p = 0,217$).

DISCUSIÓN

Estos resultados pueden explicarse por el nivel de coordinación que caracteriza a los equipos que trabajan en colaboración, así como por el nivel en el que los profesionales que trabajan en equipo llegan a compartir el conjunto de actividades clínicas, lo que resulta en una atención holística y completa. Este estudio supone una contribución al avance en la comprensión de los efectos de la colaboración interprofesional sobre los profesionales de los equipos y sobre los pacientes hospitalizados en las unidades de oncología y hematología.

Niveles elevados del mediador proinflamatorio CD40L en el síndrome metabólico

C. Natal, I. Colina, P. Restituto, J. Díez, N. Varo

1. Laboratorio de Hipertensión y Metabolismo (CN, JD, NV), Área de Ciencias Cardiovasculares, Centro de Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra. Pamplona.
2. Unidad de Chequeos (IC). Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.
3. Servicio de Bioquímica (PR, NV). Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

FUNDAMENTO

El síndrome metabólico (SM) consiste en un conjunto de factores de riesgo al que subyace un estado proinflamatorio, que se asocia a una mayor morbi-mortalidad cardiovascular. La diáda proinflamatoria

CD40/CD40L participa en el desarrollo de la aterosclerosis y sus complicaciones, pero no se ha caracterizado esta diáda en pacientes con SM. El objetivo general del presente trabajo es profundizar en los mecanismos de inflamación que subyacen al SM. Las hipótesis del presente trabajo fue que los pacientes con SM presen-

tan un aumento de la expresión del sistema CD40/CD40L.

Se plantearon los siguientes objetivos: 1. la asociación entre los niveles circulantes de sCD40L y adiponectina, y la presencia de aterosclerosis subclínica. 2. Determinar la expresión génica y proteica de CD40 y CD40L en monocitos circulantes aislados de sujetos sanos y pacientes con SM. 3. Determinar la expresión y liberación de CD40L en plaquetas aisladas de sujetos sanos y pacientes con SM. 4. el efecto de la adiponectina, vía el sistema CD40/CD40L, sobre las células asociadas al ateroma humano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 128 pacientes con SM (Criterios ATPIII) (90% varones, 56±11 años) y 246 sujetos sanos (73% varones, 54±11 años) que acudieron al Área de Riesgo Vascular de la Clínica Universitaria de Navarra. El diagnóstico de SM se estableció según los criterios del Adult Treatment Panel III del National Cholesterol Education Program (ATPIII, 2001) es decir cuando el paciente presentó 3 o más de los siguientes factores de riesgo: obesidad abdominal (circunferencia cintura >102cm en hombres y >88cm en mujeres), triglicéridos >150 mg/dL, HDL-colesterol (<40mg/dL en hombres y <50mg/dL en mujeres), hipertensión arterial (>130/85mm Hg) y glucosa plasmática en ayunas >110mg/dL. Aquellos pacientes que no cumplían el criterio de diagnóstico de SM fueron considerados control. Se determinó el espesor íntima-media carotídeo mediante ultrasonografía.

Se determinaron los niveles séricos de sCD40L y adiponectina mediante ELISA.

Los monocitos obtenidos a partir de sangre periférica, mediante gradiente de ficoll se incubaron en presencia o ausencia de 30 g/ml de adiponectina. Las células endoteliales se pre-trataron o no con TNF- (50 ng/ml) y después se incubaron en presencia o ausencia de 30 g/ml de adiponectina. Tras el cultivo, se determinó la expresión génica (4 h) y proteica (24h) del ligando CD40 y su receptor, CD40, por RT-PCR a tiempo real y western-blot.

Se extrajeron plaquetas mediante gradiente de densidad (OptiprepO) y se determinó el contenido intraplaquetar de CD40L, y la liberación plaquetar de sCD40L tras estimulación con trombina mediante ELISA.

RESULTADOS

Los pacientes con más de tres factores de riesgo del SM presentaron niveles plasmáticos de sCD40L superiores ($p<0,05$) a los que presentaban uno o dos, o ninguno ($0,88 \pm 0,1$ vs $0,79 \pm 0,08$ ó $0,65 \pm 0,12$ ng/ml, respectivamente $p<0,05$). Se observaron niveles decrecientes de adiponectina conforme aumentaba el número de factores de riesgo en pacientes con SM comparados con los individuos control ($16,5 \pm 2,0$ mg/ml vs $11,98 \pm 0,82$ mg/ml vs $10,10 \pm 0,64$ mg/ml respectivamente, $p<0,05$).

La expresión de CD40L fue superior (CD40L/18S: $0,036 \pm 0,044$) en los pacientes con SM con respecto a los controles sanos ($0,026 \pm 0,018$). Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de mRNA del receptor CD40 entre ambos grupos. La expresión proteica de CD40 fue superior en los pacientes con SM comparados con los individuos control (Unidades arbitrarias: $1,31 \pm 0,92$ vs. $0,79 \pm 0,49$, respectivamente).

La liberación plaquetar de la forma soluble sCD40L inducida por trombina (1U/ml) fue superior en pacientes con SM que en las plaquetas obtenidas de controles sanos (16,8-fold s. 4,5-fold).

La expresión, del receptor CD40 en monocitos aumentó significativamente tras la incubación con adiponectina (24 h), comparado con el control ($34,77 \pm 5,6$ vs $15,23 \pm 6,04$, respectivamente). Sin embargo, la incubación con adiponectina redujo de manera significativa la expresión del mediador proinflamatorio CD40L ($16,8 \pm 0,14$ vs $33,20 \pm 0,03$).

CONCLUSIÓN

En el contexto del concepto actual del SM como una enfermedad inflamatoria, el presente estudio muestra que la activación de la vía del CD40/CD40L puede desempeñar un papel en el mayor riesgo cardiovascular de estos pacientes. Asimismo, se muestra mayor liberación de sCD40L de las plaquetas de pacientes con SM, lo cual podría explicar el aumento de sCD40L en el plasma de estos pacientes y la mayor activación monocitaria. Finalmente, nuestros datos sugieren que la adiponectina puede ejercer un efecto anti-inflamatorio directo sobre la vasculatura inhibiendo la vía CD40/CD40L. Estas nuevas acciones anti-inflamatorias de la adiponectina pueden explicar la aparente disminución de efectos cardiovasculares no totalmente atribuibles a sus acciones hipoglucémicas.

Estudio de la administración de medicación por parte de enfermería: errores de medicación y su prevención

M.T. Díaz

Universidad de Navarra. Pamplona.

FUNDAMENTO

El principio "Primero no hacer daño" del juramento hipocrático ha sido una guía para los profesionales de salud. Sin embargo como bien se evidencia por la literatura se hace "daño" cada día. La literatura revisada pone de manifiesto la existencia de errores en los sistemas sanitarios como resultante de una acción u omisión. Dentro de todas las estructuras sanitarias existen evidencias que los hospitales, por su propia complejidad y el gran número de profesionales que interactúan entre sí y con los pacientes, acogen el mayor porcentaje de errores. Se estima que 7.000 pacientes mueren anualmente en EE.UU. como consecuencia de errores de medicación.

La actividad de Enfermería de mayor riesgo con consecuencias graves para el paciente es la que se deriva de la administración de medicación en el caso de existir errores. Sin embargo los hospitales adolecen de sistemas bien definidos y seguros que aseguren una buena práctica en la administración de medicación. y que ayuden a que las enfermeras comuniquen los errores en la administración de medicación con el fin de monitorizarlos y tener un conocimiento ajustado de esta realidad con el fin de prevenir. Por tanto nos planteamos como objetivo cuantificar y caracterizar los errores de medicación que ocurren en nuestro entorno, introducir medidas preventivas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio consistió en 4 actividades:

- Observación directa a ciegas del proceso de administración de medicación por parte del personal de enfermería. Se aleatorizan 17 enfermeras en 17 turnos que tenían que administrar medicación a 87 pacientes.

- Encuestas sucesivas de actitudes, conocimientos y creencias sobre errores de medicación al personal de enfermería en 3 momentos diferentes.
- Desarrollo e implementación de un sistema de notificación de errores.
- Desarrollo de un programa de formación y modificaciones estructurales reportadas en la literatura como efectivas.

RESULTADOS

Los resultados más relevante se han presentados en congresos internacionales y revistas científicas. Aun cuando el tiempo de observación fueron 17 horas, se detectaron 551 (24,3%) posibilidad de error en los 2263 pasos que se observaron. El 65% de las enfermeras confirman que alguna vez en su vida profesional cometieron o presenciaron un error de medicación siendo el más frecuente el debido a equivocación de paciente. Si bien son las enfermeras son el grupo profesional que más reporta errores de medicación (prescripción, dispensación y administración), menos del 6% de los errores notificados se debe a un error de administración.

DISCUSIÓN

Es la primera vez que en nuestro entorno cuantificamos de forma directa actitudes, conocimientos y creencias relacionadas con errores de medicación por parte de las enfermeras. La seguridad resulta novedosa en los sistemas sanitarios y cada vez existe una imperante necesidad de introducirla en los hospitales a través de distintos sistemas (notificación de errores, cuestionarios y observación) si realmente queremos dar una atención segura y de calidad a nuestros pacientes.

