

## **Función de circuitos cerebrales de la cognición temporal en la esquizofrenia y su relación con la atención y funciones ejecutivas: estudio de metaanálisis de neuroimagen funcional mediante estimación de la probabilidad de activación**

**F. Ortuño**

Departamento Psiquiatría y Psicología Médica. Clínica Universidad de Navarra

### **FUNDAMENTO**

Dentro de la línea de investigación sobre neuroimagen y cognición en la normalidad y la esquizofrenia nos planteamos realizar un estudio de meta-análisis de estudios de activación de la atención y estimación temporal. Los objetivos globales de nuestro proyecto se dirigían a contrastar las hipótesis de: (a) la existencia de circuitos neurales responsables de la estimación temporal en los que participan regiones prefrontales, parietales, estriadas, pálidas, talámicas y cerebelosas; (b) la disfunción estos circuitos en la esquizofrenia; (c) la importancia de estos circuitos sobre las funciones de atención y ejecutivas en la normalidad; (d) la estrecha relación entre la disfunción de estos circuitos en la esquizofrenia sobre disfunciones atencionales y ejecutivas.

El método que propusimos tiene dos pasos: en primer lugar, en una revisión bibliográfica con palabras claves, de las bases de datos ISI y Medline. En concreto se utilizaron las palabras clave: time estimation\*, timing\* OR time perception\*. Una segunda búsqueda y MA se llevó a cabo con las palabras: positron emission tomography\* y functional magnetic resonance imaging\* cruzadas con schizofrenia\*.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

De los varios miles de trabajos registrados en la bibliografía llevamos a cabo una selección aplicando los criterios específicos descritos por Pettachi et al. (2005). Finalmente recogimos los datos cuantitativos de las tablas de coordenadas espaciales (según el atlas de Taillarach) de regiones cerebrales activadas incluidas en cada una de las publicaciones y se incluyen en archivo SPSS. Finalmente, cada uno de estos archivos es procesado mediante el programa informático de método de meta-análisis.

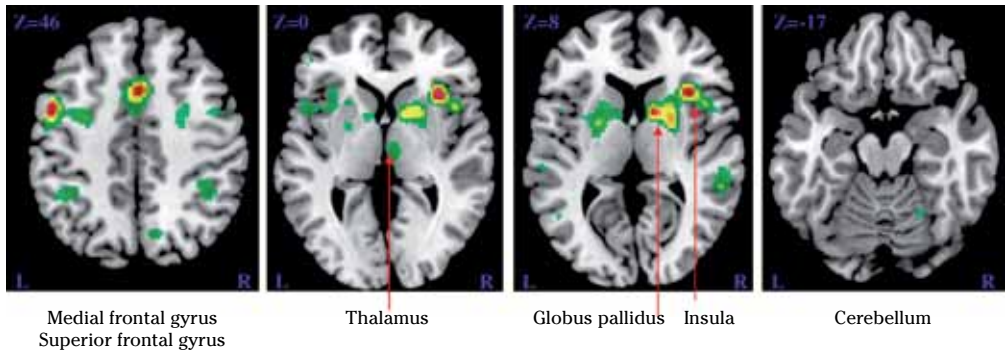
Los análisis se realizaron siguiendo las recomendaciones del consorcio BrainMap. Utilizamos el programa de software MRICron para visualizar los mapas de ALE superpuestos sobre una plantilla de alta resolución generado por el International Consortium for Brain Mapping (Kochunov et al, 2002).

Cada uno de los objetivos se corresponde con los siguientes cuatro estudios de estimación de la probabilidad de activación (ALE) de las regiones cerebrales implicadas en: (a) la estimación temporal normal; (b) la estimación temporal en la esquizofrenia respecto a la normalidad; (c) de las regiones cerebrales implicadas en tareas de atención y test de funciones ejecutivas en la normalidad; (d) en tareas de atención y test de funciones ejecutivas en la esquizofrenia respecto a la normalidad. Finalmente se efectúan sustracciones de las regiones resultantes respectivamente a-b, c-d, con el fin de examinar si los circuitos funcionales de estimación temporal, de atención y funciones ejecutivas coinciden en los estudios de normalidad y si coinciden las regiones disfuncionales en la esquizofrenia.

### **RESULTADOS**

Hasta la fecha hemos llevado a cabo dos análisis ALE de estudios de neuroimagen: uno, que incluye estudios en la normalidad (objetivo 1, ALE-a) y otro que incluye estudios comparativos entre personas sanas y pacientes con esquizofrenia (objetivo 2, ALE-b).

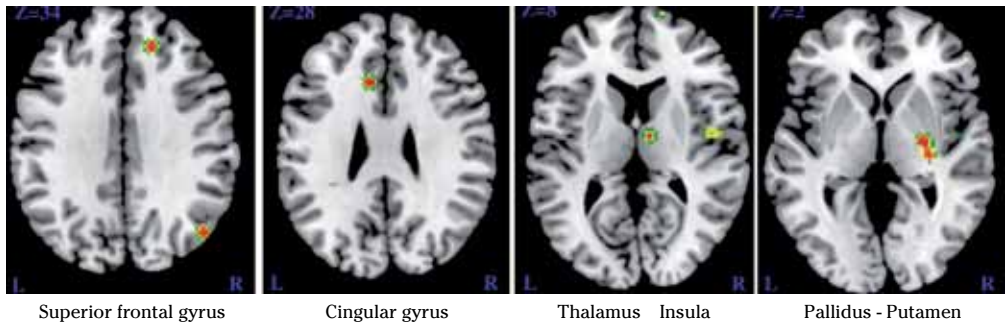
El primer MA ha replicado el resultado que los estudios de estimación temporal comparten activaciones significativamente en las regiones frontales (áreas de Broadman (BA: 6,8,9,10), parietal (BA: 40), temporales (BA: 22, 37, 41), así como caudado, putamen y tálamo, bilateralmente (Fig. 1).



**Figura 1.** Mapas de meta-análisis ALE de estudios de estimación temporal en probandos sanos (se visualizan las regiones cerebrales con activación significativa).

El segundo MA detecta activaciones significativamente reducidas ( $p < 0,05$ ) en la de regiones frontales derechas: circunvolución precentral (BA 6), superior (BA 9), media (BA 8 y10),

cíngulo (BA 32), corteza parietal derecha (BA 39) así como globus pálido, putamen y tálamo derechos (Fig. 2).



**Figura 2.** Mapas de meta-análisis ALE de estudios de estimación temporal en la esquizofrenia (regiones con menor activación en la esquizofrenia respecto a probandos sanos).

**CONCLUSIONES**

Nuestros estudios confirman la existencia de un circuito tálamo-cortico-estriatal-cerebeloso involucrado en la estimación temporal.

En la esquizofrenia, se observa una implicación deficiente en la mayor parte de las regiones

derechas de dicho circuito. Estos hallazgos sugieren un patrón de desconexión de la estimación temporal, con implicación de nuevas regiones, y enfatizan la comunicación disfuncional del hemisferio derecho/izquierdo en la percepción temporal en la esquizofrenia.

## Evaluación de las deficiencias de perfusión cerebral en la enfermedad de Parkinson y su correlación con los trastornos del sueño

M.A. Fernández Seara

Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA)

### FUNDAMENTO

La perfusión cerebral es anormal en varias patologías, en forma de hipoperfusión, hiperperfusión y/o tiempo de tránsito arterial prolongado. La técnica de "Arterial Spin Labeling" (ASL) puede proporcionar mediciones cuantitativas del flujo sanguíneo cerebral sin el uso de un agente de contraste exógeno. En este proyecto, se propuso diseñar una secuencia de ASL que aumentara la relación señal a ruido del método y redujera los artefactos de movimiento del paciente, con el objetivo de evaluar la perfusión cerebral en pacientes con enfermedad de Parkinson y estudiar la relación de las alteraciones de perfusión con los trastornos de sueño comunes en estos pacientes.

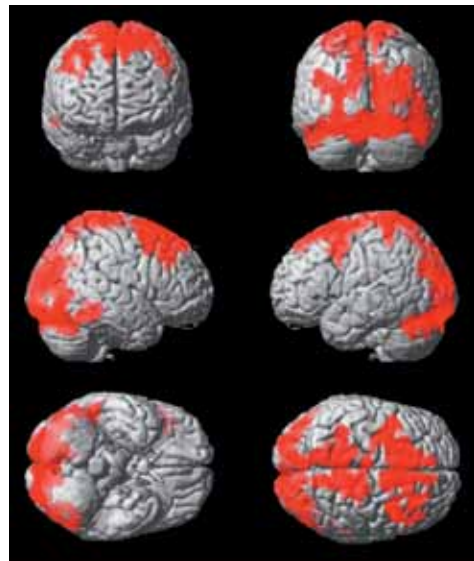
### MATERIAL Y MÉTODOS

A lo largo de este proyecto hemos mejorado la eficiencia de la técnica, de dos formas distintas: optimizando el pulso de inversión y sustituyendo el modulo de lectura por una secuencia 3D de eco de espín rápida con una trayectoria en el plano espiral. Estos dos cambios nos han permitido obtener mapas de perfusión con una señal a ruido más alta y de mejor calidad (con menos artefactos) tanto en voluntarios sanos como en pacientes de Parkinson. Usando esta secuencia hemos podido obtener mapas de perfusión cerebral en un grupo de pacientes de Parkinson y en un grupo de controles sanos de edades similares.

### RESULTADOS

La comparación de los mapas de perfusión nos ha permitido detectar las regiones cerebrales donde la perfusión en los pacientes está alterada. Hemos encontrado varias regiones de la corteza cerebral donde la perfusión está reducida, sin embargo no hemos encontrado ninguna región en donde la perfusión esté aumentada (Fig. 1). Las regiones que están hipoperfundidas en los pacientes se encuentran localizadas en los lóbulos frontal, parietal y occipital. La hipoperfusión afecta a regiones del córtex motor, premotor, y sensorial en el lóbulo frontal. Las regiones

del lóbulo parietal y occipital se relacionan con funciones visuo-espaciales. Estas deficiencias de perfusión podrían estar relacionadas con los síntomas motores y las deficiencias en tareas de carácter visuo-espacial que presentan los pacientes con enfermedad de Parkinson. Las deficiencias en procesamiento visuo-espacial y visuo-sensorial (exploración visual) son más acusadas en pacientes de Parkinson que presentan trastornos del sueño que en pacientes de Parkinson que no padecen este tipo de trastornos. Por lo tanto, esto indica que podría haber una relación entre los trastornos de sueño y las deficiencias en la perfusión. Los trastornos de sueño conllevan la presencia de apneas, durante las cuales se produce una suspensión transitoria de la respiración. La presencia de apneas ha sido relacionada con déficits en la perfusión cerebral, y podría por tanto ser una de las causas de las alteraciones de perfusión medidas en los pacientes con enfermedad de Parkinson.



**Figura 1.** Zonas de la corteza cerebral en las que la perfusión está reducida en los pacientes con enfermedad de Parkinson (en rojo).

**CONCLUSIÓN**

Los desarrollos metodológicos realizados durante la duración de este proyecto han permitido mejorar de forma significativa la calidad de los datos de perfusión obtenidos con la técnica de "Arterial Spin Labeling". Medidas de perfusión en pacientes de Parkinson han revelado im-

portantes deficiencias de flujo sanguíneo cerebral en zonas sensori-motoras del lóbulo frontal y zonas relacionadas con procesamiento visuo-espacial en lóbulos parietal y occipital. Estas deficiencias de perfusión podrían estar relacionadas con los trastornos de sueño, especialmente apneas, que son frecuentes en estos pacientes.

---

## **Acortamiento de los telómeros en el síndrome metabólico: papel del sistema enzimático de la NADPH oxidasa fagocítica**

**L. Montero, G. San José, P. García-Berbel, M.U. Moreno, Ó. Beloqui, J. Díez, A. Fortuño, G. Zalba**

Fundación para la Investigación Médica Aplicada. Área de Ciencias Cardiovasculares. Universidad de Navarra. Pamplona.

**FUNDAMENTO**

El síndrome metabólico (SM) es una enfermedad multifactorial que engloba características de las patologías hipertensiva, diabética y aterosclerótica, y la obesidad. Se trata de una patología emergente en las sociedades industrializadas, que no obstante presenta ya una creciente prevalencia que eleva significativamente el riesgo de padecer accidentes cardiovasculares.

Uno de los mecanismos que subyacen al SM es el estrés oxidativo. La principal fuente productora de anión superóxido en la vasculatura es el sistema NADPH oxidasa, presente en todos los tipos celulares de la pared vascular, incluidos los monocitos/macrófagos. Esta oxidasa está constituida por dos subunidades de membranas (gp91<sup>phox</sup> -también denominada Nox2- y p22<sup>phox</sup>) y varios componentes citosólicos. Numerosos trabajos han mostrado una mayor actividad de la NADPH oxidasa vascular en diversos modelos de hipertensión, de aterosclerosis, de diabetes y de SM. De hecho, la NADPH oxidasa participa en el estrés oxidativo presente en modelos animales de diabetes y obesidad. Así mismo, se ha descrito que una mayor producción de anión superóxido en las células fagocíticas puede desempeñar un papel importante en las alteraciones características de las patologías cardiovasculares y del SM.

Los telómeros son regiones esenciales de la cromatina que mantienen la integridad del cromosoma. En los últimos años se ha descrito un acortamiento de telómeros en los pacientes

hipertensos y diabéticos. La homeostasis de los telómeros depende de múltiples mecanismos si bien numerosas aproximaciones realizadas recientemente sugieren que el estrés oxidativo y la inflamación pueden alterar esta homeostasis y favorecer el acortamiento de los telómeros.

Con estos antecedentes proponemos que en los pacientes con SM, la activación de la NADPH oxidasa de las células fagocíticas se asocia con un mayor acortamiento en la longitud de sus telómeros. Nuestra experiencia de trabajo con pacientes con SM nos ha permitido identificar que en este grupo de pacientes son los individuos que exhiben resistencia a las acciones de la insulina en los que la activación de la NADPH oxidasa es máxima. Dado que el acortamiento de los telómeros se ha asociado también con la resistencia a la insulina, teorizamos que en el contexto de la afectación metabólica, el desarrollo de resistencia a las acciones de la insulina acelera el acortamiento de los telómeros al acentuar la activación de la NADPH oxidasa.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

El estudio se llevó a cabo en una población compuesta por 505 individuos que se sometían a un examen rutinario en nuestra Institución. De entre ellos, 227 pacientes presentaban SM. El diagnóstico de SM se estableció cuando tres o más de las siguientes alteraciones estaban presentes: obesidad central, definida por una circunferencia de cintura >102 cm en hombres

y >88 cm en mujeres; hipertrigliceridemia, definida por unos niveles de triglicéridos  $\geq 150$  mg/dL; bajo HDL-colesterol, definido como un HDL-colesterol <50 mg/dL en hombres y <40 mg/dL en mujeres; presión arterial elevada, definida por una presión arterial sistólica  $\geq 130$  mm Hg, una presión arterial diastólica  $\geq 85$  mm Hg o por el uso de medicación antihipertensiva; hiperglucemia, definida como unos niveles de glucosa  $\geq 100$  mg/dL. Un grupo de 223 pacientes no exhibían SM aunque presentaban uno o dos de los factores de riesgo definitorios del SM (grupo FRC). Finalmente, 55 sujetos sanos con ausencia de FRC constituyeron el grupo control.

Las células fagocíticas mononucleadas se aislaron a partir de muestras sanguíneas mediante un gradiente de Ficoll. La actividad NADPH oxidasa se determinó quimioluminiscentemente empleando lucigenina 5  $\mu$ M, en células mononucleadas estimuladas con el éster de forbol PMA (2 mg/L). Se determinó en plasma la concentración

de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), un marcador sistémico de estrés oxidativo. La longitud de los telómeros se determinó en el DNA genómico extraído de los leucocitos circulantes, mediante PCR. El espesor íntima-media carotídeo se determinó por ultrasonografía.

**RESULTADOS**

Las características demográficas y clínicas de los sujetos estudiados se resumen en la Tabla 1. Como era de esperar, los pacientes con SM presentaban unos valores más altos de circunferencia de cintura, de índice de masa corporal, de presión arterial, de glucosa, de triglicéridos y de insulina, y más bajos de HDL-colesterol, en comparación con los pacientes de los grupos FRC y control. Además, los pacientes con SM exhibían un espesor íntima media carotídeo aumentado con respecto al de los pacientes de los grupos FRC y control.

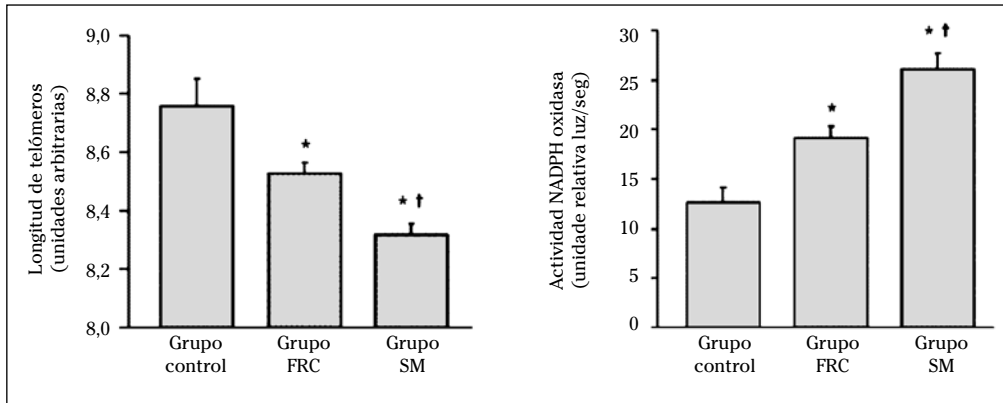
**Tabla 1.** Características demográficas y clínicas de los grupos estudiados

Parámetros	Grupo Control	Grupo 1-2MetS	Grupo 3 $\geq$ MetS	P
Edad, años	48 $\pm$ 2	55 $\pm$ 1	57 $\pm$ 1	<0,01
Sexo, Hombre/Mujer	31/24	186/37	189/38	<0,01
IMC, kg/m <sup>2</sup>	25,1 $\pm$ 0,4	27,6 $\pm$ 0,2	30,7 $\pm$ 0,3	<0,01
Perímetro abdominal, cm	84 $\pm$ 1	92 $\pm$ 1	101 $\pm$ 1	<0,01
PAS, mmHg	111 $\pm$ 1	128 $\pm$ 1	135 $\pm$ 1	<0,01
PAD, mmHg	74 $\pm$ 1	81 $\pm$ 1	84 $\pm$ 1	<0,01
Glucosa, mg/dL	87 $\pm$ 1	96 $\pm$ 1	111 $\pm$ 1	<0,01
Insulina, pmol/L	44 $\pm$ 3	66 $\pm$ 2	94 $\pm$ 2	<0,01
Índice HOMA	1,6 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,2	<0,01
HDL-colesterol, mg/dL	62 $\pm$ 2	53 $\pm$ 1	45 $\pm$ 1	<0,01
LDL-colesterol, mg/dL	141 $\pm$ 5	147 $\pm$ 3	141 $\pm$ 3	NS
Total colesterol, mg/dL	220 $\pm$ 6	221 $\pm$ 3	216 $\pm$ 3	NS
Triglicéridos, mg/dL	84 $\pm$ 4	99 $\pm$ 3	150 $\pm$ 5	<0,01
EIM carotídeo, mm	0,56 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,01	<0,01

IMC, índice de masa corporal; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; EIM, espesor íntima-media.

La longitud de los telómeros de los leucocitos circulantes era menor en el grupo de pacientes con SM que en el grupo control y en el grupo de pacientes FRC (Figura 1). La actividad NADPH oxidasa era más alta (P<0,05) en el grupo de pa-

cientes con SM que en el grupo control y de pacientes FRC (Figura 1). Los niveles plasmáticos de TBARS eran más altos (P<0,05) en el grupo de pacientes con SM (0,70 $\pm$ 0,03  $\mu$ M) que en los grupos FRC (0,58 $\pm$ 0,03  $\mu$ M) y control (0,49 $\pm$ 0,04  $\mu$ M).



**Figura 1.** (A) Longitud de telómeros. (B) Actividad de la NADPH oxidasa fagocítica.

\* $P < 0,05$  comparado con el grupo control. † $P < 0,05$  comparado con el grupo FRC.

Dado que se ha postulado que el establecimiento de la resistencia a las acciones de la insulina se asocia con el riesgo cardiovascular, procedimos a estudiar los pacientes con SM, clasificados como resistentes a la insulina (RI) o sensibles a la insulina (SI), definidos en base al índice HOMA. El análisis mostraba que los pacientes con SM y con RI exhibían una mayor actividad NADPH oxidasa, niveles más altos de TBARS, y una menor longitud de telómeros en que los pacientes con SM y SI. Es interesante resaltar que precisamente el espesor íntima-media carotídeo era máximo en los pacientes con SM y RI.

Tal y como se esperaba, la longitud de los telómeros correlacionaba negativamente con la edad. Tras corregir por edad y sexo, encontramos que la longitud de los telómeros correlacionaba negativamente con los niveles de glucosa ( $r = -0,103$ ;  $P = 0,021$ ) y de insulina ( $r = -0,119$ ;  $P = 0,019$ ), con la actividad NADPH oxidasa ( $r =$

$0,121$ ;  $P = 0,035$ ) y con los niveles plasmáticos de TBARS ( $r = -0,223$ ;  $P = 0,013$ ), y con el espesor íntima-media carotídeo ( $r = -0,153$ ;  $P = 0,022$ ).

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que la activación de la NADPH oxidasa se asocia con un acortamiento de telómeros en las células blancas de los pacientes con SM. Esta situación coincide además con un fenotipo clínico de mayor riesgo de desarrollar complicaciones ateroscleróticas.

Nuestros resultados sugieren también que el desarrollo de resistencia a las acciones de la insulina se asocia con un fenotipo más senescente de las células fagocíticas circulantes. Cabe destacar que es precisamente en los pacientes con SM y con RI en los que encontramos el mayor riesgo cardiovascular (espesor íntima-media carotídeo).

## Detección rápida de *Legionella pneumophila* mediante PCR en tiempo real en muestras clínicas y ambientales y estudio de la susceptibilidad de las bacterias en biofilms e intracelulares a agentes físicos y químicos

J. Leiva, G. Reina, A.I. Vitas, M. Fernández, M.E. Portillo, A.I. Ramos, B. Sesma

Departamento de Microbiología. Clínica Universidad de Navarra.

### FUNDAMENTO

Estudiar la susceptibilidad de *Legionella* spp frente a desinfectantes tanto en fase planctónica como en biocapas.

Evaluar la eficacia de la PCR en tiempo real para el diagnóstico precoz de legionelosis.

Comprobar la utilidad de técnicas de secuenciación como método de tipificación molecular de *Legionella pneumophila*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluó la efectividad de seis desinfectante inscritos en el Registro de Plaguicidas del Ministerio de Sanidad y Consumo (Hipoclorito sódico, HS; Clorometilisotiazolinona, CMT; 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida, DBNP; Cloruro de tributiltetradecilfosfonio, CF; Cloramina T, CT; y Cloruro de benzalconio, CB) frente a seis cepas de Legionella (*L. pneumophila* ATCC 33152, *L. pneumophila* ATCC 33823, *L. bozemanii* ATCC 33217, *L. micdadei* ATCC 33218 y 2 cepas clínicas de *L. pneumophila*). Se llevaron a cabo dos ensayos en medios diferentes (*buffered yeast extract broth* – BYE– y agua dura) para el cálculo de la concentración mínima bactericida y el efecto bactericida de los desinfectantes sobre la fase planctónica y las biocapas de Legionella. La concentración mínima bactericida de las bacterias en fase planctónica (CMB) se determinó por el método convencional de microdilución en caldo BYE. La concentración mínima bactericida de las biocapas (CBB) se determinó mediante una modificación del modelo de Calgary. Se realizaron diluciones dobles seriadas de los desinfectantes y se estableció un tiempo de contacto inóculo-biocida de 3 y 48h. La concentración mínima bactericida se definió como la menor concentración de desinfectante, expresada en partes por millón (ppm), donde los recuentos bacterianos disminuyeron un 99,9% con respecto al recuento del inóculo inicial. Para el cálculo del efecto bactericida se establecieron tiempos de contacto inóculo-biocida de 1h (efecto bactericida rápido) y 24h (efecto bactericida mínimo). El efecto bactericida rápido y mínimo de Legionella en fase planctónica (EBR y EBM, respectivamente) se determinó por el método propuesto por el *European Comitee for Standardization*. El efecto bactericida rápido y mínimo de las biocapas (EBRB y EBMB, respectivamente) se calculó mediante una modificación del modelo de Calgary aplicando las condiciones recomendadas por el *European Comitee for Standardization*. Se definió efecto bactericida como la menor concentración de desinfectante, expresada en ppm, capaz de conseguir una reducción de al menos 4 log del inóculo bacteriano inicial.

Para la evaluación de la efectividad de la PCR en tiempo real en el diagnóstico de legionelosis se recogieron muestras respiratorias, plasma y orina de 70 pacientes con diagnóstico clínico y radiológico de neumonía durante el periodo 1/1/2008-31/12/2010. Diez pacientes presentaron signos clínicos y radiológicos compatibles con neumonía además de antígeno de Legionella en orina positivo por lo que se consideraron casos probados de legionelosis. Con las muestras recogidas se realizaron los siguientes ensayos: (1) Orina: detección de antígeno (BinaxNOW®);

(2) Muestra respiratoria: cultivo BCYE selectivo (Becton-Dickinson), inmunofluorescencia directa (IFD) (MONOFLUOTM, BIO-RAD) y tres técnicas de PCR en tiempo real sobre distintos genes diana, ARNr16S (PCR16S) (Reischl, 2002), mip (LightMix®, Roche) y región intergénica ARNr5S-ARNr23S (Argene); (3) Plasma: detección de anticuerpos (FOCUS Diagnostics. VITRO) y PCR16S. La extracción del ADN se realizó con el sistema NucliSENS EasyMAG (BioMérieux) y la amplificación con el equipo LightCycler 2.0 (Roche). Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo.

Para llevar a cabo los ensayos de tipificación molecular mediante SBT (*Sequence-Based Typing*) se emplearon tanto muestras clínicas como ambientales procedentes de distintos hospitales españoles. Tras la extracción del ADN, los 7 genes escogidos para la tipificación (*asd*, *flaA*, *mip*, *mompS*, *neuA*, *pilE*, *proA*) se amplificaron mediante PCR simple y Nested PCR en el termociclador 2720 Thermal Cycler. La purificación de los amplicones se realizó usando el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit. Se secuenció el producto y se realizó un análisis del mismo mediante el software online del European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) ([http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php))

## RESULTADOS

La actividad bactericida fue diferente en función del ensayo realizado pero en ambos casos el desinfectante CF mostró valores de concentración mínima bactericida y efecto bactericida inferiores al resto tanto en fase planctónica como en biocapas de Legionella. HS y DBNP también mostraron valores bajos de efecto bactericida. En general, los tratamientos continuos (24h, 48h) mostraron valores más bajos de concentración mínima bactericida y efecto bactericida que los tratamientos de choque (1h, 3h). Comparado con las bacterias en fase planctónica, las biocapas de Legionella demostraron una mayor resistencia a los desinfectantes tras los tratamientos de choque. Esta diferencia entre las bacterias en suspensión y las que aparecen formando biocapas fue más pronunciada en el ensayo realizado para la determinación del efecto bactericida que en el desarrollado para el cálculo de la concentración mínima bactericida. Obtuvimos diferencias de hasta 4 diluciones dobles entre los valores de CMB y CBB y de hasta 7 entre los valores de EBR y EBRB tras tratamientos de 3h y 1h, respectivamente. Atendiendo a la susceptibilidad de cada cepa a los desinfectantes, *L. micdadei* presentó valores de concentración mínima bac-

tericida y efecto bactericida superiores a los de *L. pneumophila* y *L. bozemanii* para todos los desinfectantes.

Los tres ensayos de PCR en tiempo real presentaron iguales valores de sensibilidad (70%) y especificidad (100%) sobre muestras respiratorias. La PCR16S sobre plasma mostró una sensibilidad del 20%. La sensibilidad del cultivo e IFD fue igual (40%) y la especificidad de IFD resultó

algo inferior (98% frente a 100%). Las pruebas serológicas obtuvieron valores de sensibilidad del 40%.

La Nested PCR es capaz de detectar hasta 1 UFC/ml, mientras que la PCR simple es capaz de detectar entre 106 y 104 UFC/ml. A partir de la amplificación y la secuenciación de los genes elegidos para este estudio, se obtuvieron 11 perfiles o Sequence Types diferentes (Tabla 1).

**Tabla 1.** Perfiles alélicos de las cepas/muestras secuenciadas (n=71)\*

Nº cepas	ID cepas	Tipos cepas/muestras	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA	ST
52	1-3, 8-12, 15-19, 21-46, 48-50, 52-53, 55-59, 65-68	Ambiental	1	4	3	1	1	1	1	1
4	2,4,7,13	Clínica/ambiental	8	10	3	15	18	1	6	62
4	5,6,14,54	Clínica	2	3	18	15	2	1	6	20
3	61,63,64	Clínica	4	7	11	3	11	12	9	42
1	51	Clínica	2	10	18	10	2	1	9	16
1	62	Clínica	12	29	2	5	3	17	15	115
1	47	Ambiental	1	6	3	10	1	1	11	284
1	60	Clínica	2	3	6	12	2	10	6	756
1	69	Clínica	-	-	-	-	-	29	6	-
1	70	Clínica	6	41	45	51	55	10	31	864
1	71	Clínica	-	6	-	3	-	-	9	-

\*Cepa 20 no tipificada debido a su inviabilidad (no crecimiento en medio sólido).

## DISCUSIÓN

Nuestro estudio pone de manifiesto que los 6 desinfectantes estudiados presentan actividad bactericida sobre todas las cepas de *Legionella*. DBNP, CF y HS son los desinfectantes más efectivos ya que indujeron un efecto bactericida a menor concentración. Sin embargo, comprobamos que la velocidad con la que estos productos inducían el efecto bactericida era diferente para *Legionella* en suspensión y en biocapas. Para una concentración dada de desinfectante, se requería un mayor periodo de tiempo para conseguir eliminar las bacterias formadoras de biocapas que aquellas que se encontraban en suspensión. Nuestros resultados sugieren que todos los

desinfectantes estudiados son más efectivos en tratamientos continuos de desinfección. Atendiendo a las condiciones de cultivo, observamos que la resistencia de *Legionella spp.* a los desinfectantes depende del tipo de medio empleado. El HS demostró menor eficacia desinfectante en el ensayo realizado en medio BYE que en el realizado en agua dura. Estas diferencias podrían deberse a la presencia de materia orgánica en el medio BYE, ya que se ha demostrado que HS no tolera la presencia de materia orgánica. Por otro lado, este estudio nos permitió comprobar que *L. micdadei* era más resistente a los desinfectantes que *L. pneumophila* y *L. bozemanii*. Estas diferencias podrían explicarse teniendo en cuenta



la diferente composición en ácidos grasos de la pared celular de *L. micdadei*. De hecho, ésta es la única especie de *Legionella* ácido-alcohol resistente tras la tinción de Zielh-Neelsen.

Los tres ensayos de PCR en tiempo real, evaluados para las dianas ARNr 16S, mip y región intergénica ARNr 5S-ARNr 23S con muestras respiratorias, demostraron mayor eficacia diagnóstica que los métodos convencionales (cultivo, IFD y serología) y confirmaron los casos de legionelosis con la misma sensibilidad (70%) y especificidad (100%). Los valores de sensibilidad obtenidos son algo inferiores a los comunicados por otros autores, que afirman que la PCR16S y la PCR mip ofrecen valores de sensibilidad sobre muestras respiratorias del 82,1% y 80,4%, respectivamente. Una importante ventaja que ofrece la PCR16S sobre las otras dos técnicas evaluadas es su capacidad para discriminar entre *L. pneumophila* y otras especies mediante el estudio de las curvas fusión. A diferencia de los buenos resultados obtenidos en la detección de *Legionella* mediante estas técnicas de PCR en tiempo real sobre muestras respiratorias, nuestros resultados sugieren que el diagnóstico de legionelosis mediante la PCR16S empleando muestras de plasma es poco efectivo ya que obtuvimos una sensibilidad del 20%. Estos bajos valores de sensibilidad coinciden con los reflejados en un reciente trabajo que demuestra que del total de pacientes con diagnóstico probado de legionelosis sólo 30,9% de los casos pudieron ser confirmados mediante la PCR16S sobre muestras de suero. Esta baja sensibilidad podría

explicarse por la presencia de inhibidores de la amplificación presentes en las muestra o por la congelación previa de las muestras que podría inducir una degradación parcial del DNA bacteriano.

Con el desarrollo de este estudio se han comprobado las ventajas del método *Sequence-Based Typing*. La puesta a punto de la técnica no resultó laboriosa y la obtención de resultados fue rápida en comparación con otros métodos de tipificación como la electroforesis en campo pulsado. Es una técnica objetiva, reproducible y los datos son fácilmente intercambiables entre diferentes laboratorios. Otra de las ventajas del *Sequence-Based Typing* es que su sensibilidad puede mejorarse con la introducción de la Nested PCR. El propósito de este estudio era comprobar la aplicabilidad de las técnicas de secuenciación a la tipificación molecular de *L. pneumophila* y atendiendo a los resultados obtenidos se puede afirmar que las técnicas de secuenciación son efectivas a la hora de tipificar diferentes cepas de *L. pneumophila* ya que se obtuvieron 11 perfiles alélicos diferentes. Comparando los datos ambientales y clínicos se puede decir que las cepas clínicas muestran más variabilidad genotípica que las ambientales. El perfil alélico más común entre las cepas ambientales de la colección de la Clínica Universidad de Navarra es el I, siendo también el que presentan las cepas ambientales procedentes del Hospital General de Riotinto de Huelva (cepas 65-68), por lo que podría tratarse de una cepa muy prevalente en los ambientes acuáticos de nuestro medio.

---

## Factores que influyen en la realización de actividades comunitarias de promoción de la salud por los equipos de atención primaria

L. Elizalde, M. Echaury, M.J. Pérez, P. Marín, E. Ancizu, L. Jusué, J. Castilla

Instituto Salud Pública. Pamplona

### FUNDAMENTO

Las actividades comunitarias son un área de trabajo de reconocida importancia para el buen desarrollo de la Atención Primaria (AP) y de probada efectividad para el abordaje de importantes factores determinantes de la salud de la población.

Sin embargo parece estar implantada de un modo desigual y no sistemático en los equipos de atención primaria (EAP), por lo que esta pro-

puesta pretende conocer los factores que hacen que unos EAP realicen actividades y otros no.

Se pretende que esta información ayude a potenciar acciones de promoción de las actividades comunitarias a directivos y profesionales sanitarios.

Además, también se pretende describir qué tipo de actividades comunitarias se están realizando actualmente por los EAP, para avanzar en el conocimiento de las mismas y orientar los conocimientos hacia los criterios de gestión de AP.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio observacional, retrospectivo, de tipo caso control. Se han consensuado criterios de definición de actividades comunitarias y se han identificado en cinco comunidades autónomas centros y profesionales que cumplen criterios de inclusión como realizadores de dichas actividades (casos), profesionales que pertenecen a centros que realizan actividades comunitarias (AC) pero no las realizan ellos (controles alfa) y profesionales que trabajan en centros que no realizan AC (controles beta).

La información obtenida se grabó en un programa Access y en primer lugar se realizó un análisis descriptivo de todas las variables recogidas, a nivel global y por CCAA, excepto las referidas a características de las actividades comunitarias.

Se contrastó la distribución de las variables en los centros alfa y en los centros beta expresadas como porcentajes y medias con sus intervalos de confianza al 95% y se evaluó la relación de las variables independientes con la realización de actividades comunitarias, usando el test ji cuadrado para las variables categóricas y el test t-Student para las variables continuas si éstas se ajustan a una distribución normal.

La fuerza de la asociación se expresó mediante las odds ratio crudas y sus intervalos de confianza al 95%. Se realizó un análisis multivariante de regresión logística, en el que la variable dependiente era la realización o no de actividades comunitarias. Para la construcción del modelo se partió del modelo saturado, introduciendo todas aquellas variables con una significación  $p < 0,25$  en el análisis bivalente y aquellas que se consideraba que puedan influir en el modelo. Usando el método backward, se fueron eliminando aquellas variables que en el test de Wald no tengan una significación  $p < 0,05$  y que no supongan una variación remarcable en los coeficientes beta estandarizados de las variables en el modelo. Los modelos nuevos se fueron comparando con los modelos anteriores mediante el método de máxima verosimilitud, hasta seleccionar el modelo explicativo más adecuado. El análisis estadístico se realizó mediante los programas epidat 3,1 y spss v.15.

Para la realización de AC incluidas en cartera de servicios de la totalidad de centros de Navarra se realizaron análisis descriptivos según tipos de actividades y años de realización a partir de las bases de datos proporcionadas por la DAP.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

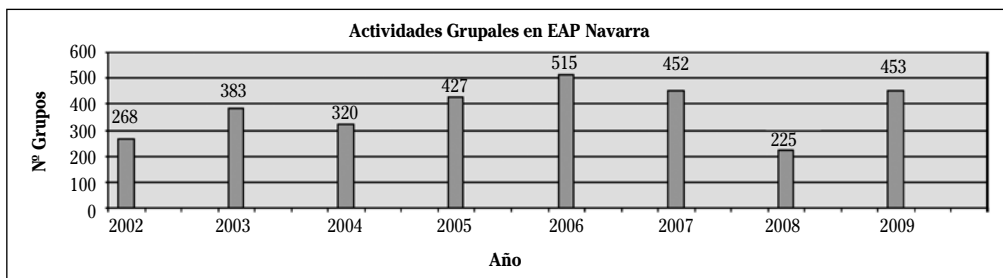
Los EAP de Navarra realizan en los últimos años un importante número de actividades comunitarias y de educación para la salud (EpS) grupal, independientemente del criterio utilizado para categorizarlas.

Las AC más frecuentes son las de EpS grupal y la participación del EAP en redes y o campañas comunitarias, y más del 80% de EAP las realizan.

Quienes más han participado en estas actividades han sido las profesionales de enfermería y en menos medida las de trabajo social, siendo escasamente relevante en lo cuantitativo la participación de profesionales de medicina de familia o pediatría.

Estas actividades quedan en parte invisibilizadas al utilizar para definir AC los criterios que se han usado en el estudio multicéntrico FRAC: no ser una actividad puntual, que los profesionales que participan lo hagan en representación del equipo, que participe la ciudadanía de manera activa y que participen otros sectores sociales diferentes al de salud.

Consideramos que se debería encontrar un ajuste entre los criterios seguidos por la DAP y el estudio FRAC, para definir actividades comunitarias por la DAP para evaluación de los EAP que permitan visibilizar la evolución de la actividad extraasistencial, que no siempre se produce mediante saltos cualitativos, pero que es un avance notable sobre la estricta actividad asistencial individual y curativa. Creemos que la evolución hacia las AC con criterios definidos en FRAC se realiza mediante transiciones progresivas y evaluación permanente de su utilidad, y no reconocerlo así podría restar motivación de profesionales, y al tiempo a la transición hacia la realización de actividades comunitarias progresivamente más complejas y de mejor calidad.



**Tabla 1.** Relación de variables del profesional con realización de actividades comunitarias

Variables	Casos N (%)	Controles alfa N (%)	P*	OR crudos (IC 95%)
<b>CCAA</b>				
Baleares	39 (11)	47 (13,5)		1 (referencia)
Madrid	97 (27,5)	85 (24,4)		1,37 (0,82-2,30)
Cataluña	123 (34,8)	113 (32,5)		1,31 (0,80-2,15)
Aragón	66 (18,7)	75 (21,6)		1,06 (0,62-1,82)
Navarra	28 (7,9)	28 (8)		1,2 (0,61-2,36)
<b>Sexo</b>				
Hombre	57 (16,3)	88 (26)		1 (referencia)
Mujer	293 (83,7)	251 (74)		1,80 (1,24-2,62)
<b>Profesión</b>				
Enfermera	225 (63,7)	136 (39,1)		1 (referencia)
Médico de familia	60 (17)	173 (49,7)		0,21 (0,14-0,30)
Pediatra	32 (9,1)	36 (10,3)		0,54 (0,32-0,9)
Trabajador social	36 (10,2)	3 (0,9)		2,25 (1,46-3,47)
<b>Médicos con MIR Medicina de Familia</b>	36 (60)	112 (64,7)	0,511	<b>0,82 (0,45-1,49)</b>
<b>Médicos tutores de residentes</b>	17 (28,3)	52 (30,1)	0,801	0,92 (0,48-1,76)
<b>Tutores de residentes de enfermería (pre y postgrado)</b>	136 (60,4)	55 (40,4)	<b>0,000</b>	2,25 (1,46-3,47)
<b>Situación laboral</b>				
Fijo	288 (81,6)	259 (74,4)		1 (referencia)
Interino	52 (14,7)	67 (19,3)		0,70 (0,47-1,04)
Otros	13 (3,7)	22 (6,3)		0,53 (0,26-1,08)
<b>Sí participación en proyectos de investigación últimos 5 años</b>	180 (53,4)	160 (47,3)	0,114	1,27 (0,94-1,73)
<b>Sí formación específica en AC</b>	200 (58,8)	107 (32)	<b>0,000</b>	3,03 (2,21-4,15)
<b>Satisfacción laboral</b>				
No satisfecho-poco satisfecho	21 (6)	32 (9,3)		1 (referencia)
Medio satisfecho	92 (26,2)	120 (34,8)		1,17 (0,63-2,16)
Bastante-muy satisfecho	193 (67,8)	193 (65,9)		1,89 (1,05-3,56)
<b>Satisfacción ambiente laboral</b>				
No satisfecho-poco satisfecho	23 (6,6)	35 (10,1)		1 (referencia)
Medio satisfecho	108 (30,8)	98 (28,4)		1,68 (0,93-2,22)
Bastante-muy satisfecho	220 (62,7)	212 (61,4)		1,58 (0,93-2,76)
<b>Autoconfianza para realizar AC</b>				
Ninguna-Poca	42 (12)	79 (23,1)		1 (referencia)
Media	118 (33,7)	156 (45,6)		1,42 (0,91-2,22)
Bastante-Mucha	190 (54,3)	107 (31,3)		3,34 (2,14-5,20)

En la realización de AC en este estudio se identifican dos grupos de variables que influyen en su realización: las que afectan al centro o la comunidad implicada, y las que afectan a profesionales que realizan AC.

Entre las variables que afectan a los centros que realizan AC se identifican que la comunidad atendida sea de nivel socioeconómico bajo, así como que el centro participe en el Consejo de Salud cuando lo hay.

Igualmente se relacionan con mayor número de AC que el centro tenga mayor número de enfermeras, menores ratios de pacientes, y el número de años de funcionamiento del centro. Por el contrario se comporta como una dificultad para hacer AC la presencia de estudiantes de enfermería en el centro.

Entre las variables identificadas en las personas que realizan AC encontramos una mayor probabilidad asociada a las siguientes variables: ser mujer; ser enfermera o trabajadora social; ser tutora de enfermeras en formación (pregrado y postgrado); tener formación específica en AC; tener alta satisfacción laboral; y bastante o mucha confianza en la propia capacidad de desa-

rollar AC. La situación laboral estable también se relaciona con la participación en AC.

Respecto a las opiniones de profesionales que mejor se asocian a realizar AC están: tener más confianza en la eficacia de las AC; estar más motivado para realizarlas; apoyar más la participación ciudadana en sus propios procesos de salud y en el mismo sistema de salud; tener más claro su rol profesional respecto al trabajo comunitario; encontrar más relación entre los trabajos de educación para la salud y la participación comunitaria; y el valorar más la utilidad de los consejos de salud.

Entre las variables asociadas a la sensibilidad de cada profesional a lo social o comunitario y algunas sobre su percepción del trabajo de equipo en el EAP se manifiestan como favorables a las AC: participar en actividades en el mismo barrio en el que trabaja; colaborar con alguna ONG o entidad cívica; sentir que se tiene autonomía para gestionar la agenda; sentir que hay otros profesionales en el EAP que le pueden cubrir a uno para hacer AC; sentir que hay en el EAP profesionales con quienes contar para realizar AC.

---

## Anticuerpos agonistas anti-CD137 humano: caracterización funcional de mecanismos antitumorales

I. Marínez-Forero<sup>1</sup>, A. Palazón<sup>1</sup>, A. Azpilikueta<sup>1</sup>, A. Morales-Kastresana<sup>1</sup>, O. Murillo<sup>1</sup>, J.L. Pérez-Gracia<sup>2</sup>, S. Hervás-Stubbs<sup>1</sup>, I. Melero<sup>1,2</sup>

1. Fundación de Investigación Médica aplicada (FIMA)

2. Clínica Universidad de Navarra

### FUNDAMENTO

CD137 (4-1BB) es una glicoproteína de membrana que fue originalmente descubierta en linfocitos T y NK en estado de activación, pero no en reposo. Su patrón de expresión en realidad abarca otras poblaciones linfoides y mieloides que incluyen células dendríticas y linfocitos B. Funcionalmente se comporta como una molécula de coestímulo que favorece la activación y sobre todo la supervivencia de la célula sobre la que CD137 ha sido estimulado. Se conoce solamente un ligando natural (CD137L) cuya expresión parece restringida a la superficie de células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. La expresión de CD137L depende del estado de activación/maduración de las células presentadoras de antígeno.

La estimulación artificial de CD137 con anticuerpos monoclonales agonistas determina la potenciación de respuestas mediadas por linfocitos T citotóxicos (CTL) y por linfocitos Natural Killer (NK). Como resultado de esto la administración a ratones portadores de tumores de anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137 determina un notable incremento de la intensidad de la respuesta inmunitaria anti-tumoral que en muchos casos da como resultado el rechazo completo del tejido maligno. Una estrategia equivalente se está ensayando clínicamente en pacientes con cáncer (ensayos fase I/II) con anticuerpos monoclonales humanos desarrollados por las compañías farmacéuticas Bristol Myers-Squibb y Pfizer inc. El conocimiento de los distintos requerimientos celulares y moleculares que determinan el rechazo tumoral se conside-

ran cruciales para mejorar los efectos terapéuticos, en particular, contribuyendo al diseño de las combinaciones más eficaces de tratamiento.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado ratones transplantados con diferentes líneas tumorales singénicas. Algunas de estas líneas tumorales están transfectadas para expresar el gen de la albúmina del huevo de gallina. Esto es así puesto que disponemos de múltiples herramientas celulares y moleculares para medir con precisión la respuesta inmunitaria frente a este antígeno. Entre las herramientas disponibles disponemos de ratones transgénicos para receptores de antígeno de linfocitos T con especificidad para los epítomos inmunodominantes de la albúmina del huevo. Para analizar los requerimientos moleculares se han utilizado ratones modificados genéticamente que carecen de CD137, IFN $\gamma$ , receptor de IFN $\alpha/\beta$ , IL-2R $\gamma$ , CD4 ó CD8. Se ha utilizado también un ratón transgénico en el que se pueden eliminar las células dendríticas mediante el tratamiento con toxina diftérica.

La respuesta inmunitaria frente a antígenos tumorales se mide "in vitro" mediante técnicas de citotoxicidad (ensayos de liberación de cromo51), proliferación linfocitaria y liberación de citocinas. La respuesta inmunitaria "in vivo" se mide mediante ensayos de citometría de flujo sobre la población linfocitaria activada, ensayos de citotoxicidad "in vivo" con dianas celulares cargadas artificialmente con el antígeno relevante y seguimiento de linfocitos marcados con especificidad conocida que son transferidos adoptivamente.

Los tumores se han estudiado mediante técnicas de inmunohistoquímica y purificando el infiltrado inflamatorio y las células endoteliales vasculares presente en los mismos mediante técnicas de inmunofluorescencia y citometría de flujo.

## RESULTADOS

El tratamiento con anticuerpos anti-CD137 consigue efectos terapéuticos potentes sobre tumores hematológicos que incluyen mielomas y linfomas. En estos modelos hemos comprobado que el efecto terapéutico es más potente que el conseguido con anticuerpos neutralizantes de CTLA-4. Así mismo, se ha podido verificar la contribución de linfocitos NK activados lo cual permite su explotación terapéutica potenciando efectos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos dirigidos frente a células tumorales.

Hemos comprobado también que para que los anticuerpos anti-CD137 puedan activar la respuesta inmune antitumoral es importante el papel de las células dendríticas que presentan los antígenos tumorales endógenos.

En tumores sólidos hemos puesto de manifiesto una contribución del endotelio presente en vasos tumorales y que no era esperada. Hemos observado que el endotelio capilar en tumores transplantados y espontáneos de ratón expresa CD137. Esta expresión ectópica de CD137 que no se observa en vasos normales y hemos demostrado que depende de hipoxia a través de un mecanismo dependiente del factor de transcripción HIF1 $\alpha$ . La experimentación ha permitido establecer que el estímulo de la glicoproteína CD137 en endotelio con anticuerpos monoclonales agonistas determina su activación proinflamatoria, de manera que el endotelio expresa moléculas de adhesión que favorecen el infiltrado por parte de linfocitos activados.

El mecanismo de acción antitumoral de los anticuerpos anti-CD137 depende críticamente de la producción de IFN $\gamma$  por parte de linfocitos T. En cambio el mecanismo de acción de los anticuerpos agonistas anti-CD137 es independiente del sistema de interferon de tipo I (IFN $\alpha/\beta$ ). Esto nos advirtió de la idea para establecer un potente efecto sinérgico antitumoral mediante una estrategia consistente en la administración de IFN $\alpha$  por vía intratumoral y de anticuerpos agonistas anti-CD137 por vía sistémica. La contribución del IFN $\alpha$  es multifactorial, pero destacan sus efectos locales sobre células dendríticas y sus efectos indirectos sobre la expresión de CD137 en linfocitos respondedores.

Desde el punto de vista de la señalización intracelular hemos puesto de manifiesto que CD137 tras ser estimulado se internaliza a un compartimento endosomal (que hemos denominado CD137-*signalling endosomes*) donde se pone en marcha señalización citoplásmica dependiente de la actividad del adaptador TRAF-2. TRAF-2 es una ubiquitín-ligasa E3 que cataliza la ubiquitinación de proteínas con polímeros de ubiquitina ancladas unas a otras por su lisina-63. Al contrario que los polímeros unidos por lisina 48 que determinan degradación proteica, los polímeros de lisina-63 son críticos para el reclutamiento de factores como TAK1 que ponen en marcha la maquinaria de NF- $\kappa$ B y de MAP-kinasas. Nuestros resultados indican que los endosomas de internalización de CD137 se decoran de ubiquitinas polimerizadas vía lisina-63. Estos fenómenos ocurren en linfocitos infiltrantes de tumor tras inyectar los anticuerpos y se han observado tanto en linfocitos activados primarios de ratón y de humano. Mediante la transfección

de variantes genéticas dominantes negativas de TRAF-2 (carentes del dominio E3 Ub-ligasa) y ubiquitina (que tiene mutada su lisina 63) hemos puesto de manifiesto que estos elementos son críticos en la activación de NF- $\kappa$ B inducido a través de la estimulación de CD137.

## CONCLUSIÓN

El efecto terapéutico antitumoral que desencadena la estimulación farmacológica de CD137 depende de múltiples tipos celulares entre los que destacan linfocitos T citotóxicos y células NK. Hemos puesto de manifiesto el papel de las células dendríticas que presentan antígenos tumorales y del endotelio de los vasos tumorales

que expresan ectópicamente CD137 como respuesta a hipoxia. Hemos comprobado que la estimulación de CD137 en el endotelio de los vasos tumorales favorece la penetración de linfocitos T efectores en el tejido maligno. Por tanto, el tratamiento no sólo estimula selectivamente a los linfocitos T que han reconocido antígeno sino que también les abre la puerta de entrada al tejido tumoral. Asimismo, hemos puesto de manifiesto los mecanismos tempranos de traducción de señales a través de CD137. Mediante todos estos conocimientos hemos diseñado y realizado la prueba de concepto de nuevas estrategias de inmunoterapia combinada que tienen efecto sinérgico en el tratamiento de tumores considerados pobremente inmunogénicos.

---

## Factores asociados a la disfunción muscular de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**M.M. Antón<sup>1</sup>, F. Zambom<sup>1</sup>, M. Hernández<sup>2</sup>, J.A. Cascante<sup>2</sup>, E. Gorostiaga<sup>3</sup>, J. Ibañez<sup>3</sup>, J. Hueto<sup>2</sup>, L. Rezusta<sup>4</sup>, L. Val<sup>4</sup>, M. Izquierdo<sup>3</sup>, P. Cebollero<sup>2</sup>**

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

2. Servicio de Neumología B. Complejo Hospitalario de Navarra

3. Centro de Estudios, Investigación y Medicina del Deporte. Instituto Navarro del Deporte

4. Servicio de Medicina Física y Rehabilitación. Complejo Hospitalario de Navarra

## FUNDAMENTO

La disfunción muscular periférica es uno de los efectos sistémicos extrapulmonares de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), limitando la capacidad funcional, la calidad de vida, la fuerza muscular de los músculos periféricos y, además, incrementando el riesgo de mortalidad. Esta disfunción muscular periférica ha sido asociada en parte a un desajuste del condicionamiento físico. Por ello, las principales sociedades científicas y clínicas de neumología y rehabilitación europea y norteamericanas recomiendan la inclusión del ejercicio físico como componente esencial dentro de los programas de rehabilitación respiratoria.

Tradicionalmente, el entrenamiento aeróbico ha sido el componente fundamental en los programas de ejercicio físico para EPOC con el objetivo de mejorar la resistencia aeróbica, la

fatiga y, la disnea durante las actividades de la vida diaria. Recientemente, se ha observado la importancia de los programas de fuerza muscular como estrategia fundamental para prevenir la disfunción muscular periférica, aumentando la fuerza máxima dinámica, la masa muscular y, reduciendo la fatiga muscular. En los últimos años, se ha empezado a recomendar la inclusión de ambos tipos de entrenamiento en los programas de rehabilitación respiratoria. Hasta la fecha, los grupos que realizaban el entrenamiento combinado de fuerza muscular y resistencia aeróbica realizaban el entrenamiento de resistencia aeróbica (2-3 sesiones semanales) y, además, 2-3 sesiones semanales de entrenamiento de fuerza muscular. Sin embargo, no se conoce cuál es la combinación (intensidad, frecuencia y duración) de entrenamiento de fuerza muscular y de resistencia aeróbica óptima dentro de los programas de rehabilitación respiratoria.

**Tabla 1.** Valores medios (media±DE) de las características antropométricas y la función pulmonar en la semana 0, y en la semana 12 de entrenamiento en el grupo FR, grupo FF y en el grupo CO. \*P<0,01

	Grupo FR (n=14)	Grupo FF (n=14)	Grupo CO (n=8)
<b>Edad (años)</b>	68±7	68±7	69±5
<b>Peso (kg)</b>			
Semana 0	82,4±22,5	81,9±10,2	70,8±17,3
Semana 12	82,8±22,9	81,9±9,1	70,3±18,0
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>			
Semana 0	29,3±6,4	28,5±4	25,7±4,6
Semana 12	29,4±6,6	28,5±4	25,6±4,9
<b>FEV<sub>1</sub> (% ref.)</b>			
Semana 0	44,3±11,9	47,8±11,7	38,7±5,01
Semana 12	45,4±13,4	48,9±13,3	43,9±13,0
<b>FVC (% ref.)</b>			
Semana 0	73,6±18,8	74,4±15,2	72,7±8,0
Semana 12	75,9±19,0	76,9±17,1	73,1±8,5
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC</b>			
Semana 0	44,5±10,3	45,9±7,0	39,2±6,4
Semana 12	43,9±11,4	45,8±7,7	41±10,1
<b>CPT (% ref.)</b>			
Semana 0	122,3±23,4	114,4±16,7	121,3±15,6
Semana 12	121,3±26,4	111,4±20,0	114,4±17,2
<b>CI/CPT(%)</b>			
Semana 0	0,28±0,1	0,33±0,1	0,28±0,2
Semana 12	0,27±0,1	0,29±0,1	0,23±0,1
<b>PI<sub>max</sub> (cmH<sub>2</sub>O)</b>			
Semana 0	79,6±27,3	88,9±28,9	78,4±22,9
Semana 12	76±27,9	92,2±21,6	73,6±19,7
<b>PE<sub>max</sub> (cmH<sub>2</sub>O)</b>			
Semana 0	101±34,6	109,5±34,7	80,4±20,5
Semana 12	94,6±40,8	112±36,6	67,9±14,4
<b>T6MM (m)</b>			
Semana 0	475,9±129,1	492,1±99,5	459,9±93,2
Semana 12	512,2±128,8*	528,1±101,1*	460±90,66
<b>CRQ (Δ)</b>			
Disnea	0,9±0,9	1±0,8	0,1±0,8
Fatiga	0,8±0,8	0,8±0,8	-0,03±0,2
Función emocional	0,6±0,6	0,6±0,8	0,11±0,6
Control enfermedad	0,5±0,8	0,8±1,1	-0,06±0,5

Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; FEV<sub>1</sub>, volumen espirado forzado en el primer segundo; FVC, capacidad vital forzada; CPT, capacidad pulmonar total; CI/CPT, ratio capacidad inspiratoria/capacidad pulmonar total; PI<sub>max</sub>, presión inspiratoria máxima; PE<sub>max</sub>, presión espiratoria máxima; T6MM, test de 6 minutos marcha; CRQ, cuestionario de calidad de vida: <0,05, cambio menor que la diferencia mínima importante, 0,5-0,75: cambio de pequeña magnitud, 0,75-1,25: cambio de moderada magnitud, 1,50: cambio de gran magnitud. \*P<0,01: significación intragrupo entre la Semana 0 y la Semana 12.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue comparar los efectos de realizar 12 semanas de entrenamiento combinado de fuerza máxima y resistencia aeróbica de bajo volumen (1 sesión fuerza y 1 sesión resistencia por semana) con los de un programa de entrenamiento de fuerza

máxima de bajo volumen (2 sesiones por semana) en la capacidad pulmonar, en el índice BODE, en la calidad de vida, en el test de 6 minutos marcha, en la fuerza muscular, en la potencia muscular y, en la resistencia aeróbica en pacientes con EPOC grado moderado-severo. Las hipóte-

sis de este estudio fueron: 1) un programa de una sesión a la semana de fuerza máxima y otra sesión a la semana de resistencia aeróbica se acompaña de un aumento de la producción de fuerza y potencia muscular inferior al observado en el grupo que realiza un entrenamiento exclusivo de fuerza máxima y, 2) un programa de bajo volumen de dos sesiones a la semana de entrenamiento de fuerza máxima mejora significativamente la fuerza máxima, la potencia muscular y, la calidad de vida en pacientes con EPOC grado moderado-severo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron 36 pacientes EPOC con grado moderado y severo (GOLD), disnea 2-3 (MMRC). Se valoró la función pulmonar, el test de 6 minutos marcha, el BODE (predicción de mortalidad), la potencia aeróbica máxima ( $W_{max}$ ), la fuerza máxima dinámica del miembro inferior ( $1RM_{MI}$ ) y superior ( $1RM_{MS}$ ), la potencia del miembro inferior al 70%  $1RM$  ( $POT70_{MI}$ ) y, la calidad de vida (CRQ), antes y después de 12 semanas de programa de ejercicio físico. Se asignaron aleatoriamente los sujetos en tres grupos: grupo Fuerza-Fuerza (FF, n=14, 50-70%  $1RM$ , 2 días a la semana), grupo fuerza y resistencia aeróbica (FR, n=14, 65-90% frecuencia cardiaca máxima, 1 día a la semana y 50-70%  $1RM$ , 1 día a la semana) y grupo control (CO, n=8, que no realizó ningún tipo de programa). Se utilizó estadística estándar y análisis de varianza con medidas repetidas. El valor de  $P < 0,05$  fue el criterio utilizado para establecer diferencias significativas.

## RESULTADOS

No hubo diferencias significativas en las variables medidas al inicio del estudio entre los tres grupos. En la tabla 1 se observa que no hay cambios significativos en el peso corporal, IMC y, en ninguna de las variables pulmonares después del periodo de intervención. La distancia en el test de 6 minutos marcha incrementó  $36 \pm 37$  metros ( $P < 0,01$ ) en FR y  $36 \pm 30$  metros ( $P < 0,01$ ) en FF (Tabla 1). Se observó un efecto grupo según el tiempo ( $P < 0,05$ ). El incremento absoluto fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) en FF y FR que en CO. En FR, se observó un cambio de moderada magnitud en la disnea, fatiga y, un cambio de pequeña magnitud en la función emocional y control de la enfermedad. En FF, se

observó un cambio de moderada magnitud en la disnea, fatiga y control de la enfermedad y, un cambio de pequeña magnitud en la función emocional (Tabla 1).

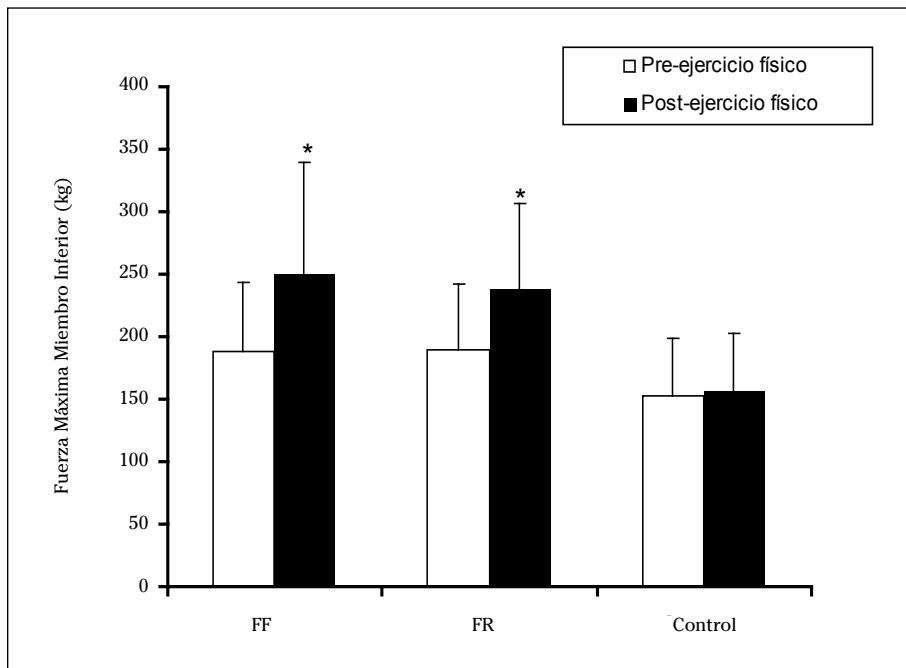
La  $1RM_{MI}$  (Fig. 1) incrementó un 25,8% (de  $189,6 \pm 52,8$  a  $238,4 \pm 68,2$  kg;  $P < 0,001$ ) en FR, un 33,1% (de  $187,7 \pm 55,1$  a  $250,3 \pm 89,3$  kg;  $P < 0,001$ ) en FF. Se observó un efecto grupo según el tiempo ( $P < 0,01$ ). La magnitud de mejora en ambos grupos fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) que en CO. La  $1RM_{MS}$  incrementó un 31,3% (de  $50,4 \pm 12,2$  a  $66,3 \pm 18,1$  kg;  $P < 0,001$ ) en FR, 35,8% (de  $51,4 \pm 17,8$  a  $67,5 \pm 17,4$  kg;  $P < 0,001$ ) en FF. Se observó un efecto grupo según el tiempo ( $P < 0,001$ ). La magnitud de mejora en ambos grupos fue significativamente superior ( $P < 0,001$ ) que en CO. No existieron diferencias en la magnitud de mejora de la fuerza máxima entre FR y FF. La  $POT70_{MI}$  incrementó un 49,84% (de  $557,47 \pm 290,48$  a  $725,5 \pm 258,4$  W;  $P < 0,001$ ) en FR, un 32,68% (de  $609,87 \pm 171,19$  a  $797,29 \pm 212,43$  W;  $P < 0,001$ ) en FF. Se observó un efecto grupo según el tiempo ( $P < 0,01$ ). El  $W_{max}$  incrementó un 13,58% en FR (de  $83,64 \pm 37,33$  a  $91,63 \pm 33,27$  W;  $P < 0,05$ ) y un 2,33% en FF (de  $81,53 \pm 25,71$  a  $81,89 \pm 23,52$  W; N.S.).

El índice BODE disminuyó un 35,89% (de  $3,5 \pm 1,8$  a  $2,6 \pm 2,2$  puntos,  $P < 0,001$ ) en FR y un 44,87% (de  $3,0 \pm 1,2$  a  $1,69 \pm 0,9$  puntos,  $P < 0,001$ ) en FF. La magnitud observada fue significativamente superior ( $P < 0,01$ ) en FF y FR que en CO, siendo similar entre FR y FF.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que un programa de ejercicio físico de 12 semanas de bajo volumen (2 días a la semana) es estímulo suficiente para mejorar la disnea, la fatiga, la distancia mínima clínicamente significativa en el test de 6 minutos marcha, la fuerza máxima del miembro superior e inferior y la potencia del miembro inferior. Igualmente, un día a la semana es estímulo suficiente para mejorar la fuerza máxima del miembro superior e inferior y la potencia del miembro inferior y, además, se obtienen las mismas mejoras que realizando dos días a la semana de entrenamiento de fuerza. El programa fuerza y resistencia parece ser más efectivo que el programa de entrenamiento de fuerza porque la mejora de la potencia aeróbica máxima fue superior que en el programa de fuerza muscular.





**Figura 1.** Valores medios (+DE) en kg, de fuerza máxima dinámica del miembro inferior en el grupo FF (n=14), en el grupo FR (n=14) y en el grupo CO (n=8) durante las 12 semanas de entrenamiento (semanas 0 a 12). Efecto grupo x tiempo ( $P<0,01$ ). Significación intragrupo: entre las semanas 0 y 12 ( $P<0,001$ ).

## Identificación de nuevos factores de riesgo de hemorragia gastrointestinal grave en pacientes con tratamiento anticoagulante

**R. Montes Díaz**

Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA)

### FUNDAMENTO

Los anticoagulantes orales que reducen la disponibilidad de vitamina K, en nuestro entorno el acenocumarol o sintrom, son utilizados en la prevención de la enfermedad tromboembólica. No obstante, la anticoagulación excesiva puede predisponer al paciente a experimentar hemorragias. Existe una variabilidad interindividual importante en cuanto a la sensibilidad al acenocumarol, condicionada por factores genéticos y ambientales. No se conoce hasta qué punto dichos factores incrementan el riesgo de experimentar una hemorragia gastrointestinal severa. Planteamos como primera hipótesis que

existen factores genéticos y ambientales que condicionan el riesgo de experimentar una hemorragia gastrointestinal grave en pacientes anticoagulados con acenocumarol. Asimismo, también planteamos la hipótesis de que los factores genéticos a los que hemos aludido condicionen la dosis de acenocumarol óptima para alcanzar un grado de anticoagulación adecuado.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Acenocumarol y hemorragia digestiva

Se incluyeron finalmente 89 pacientes consecutivos sometidos a terapia anticoagulante

con acenocumarol que acudieron al hospital de Navarra por presentar una hemorragia gastrointestinal grave y 177 individuos sujetos a la misma terapia pero que no hubieran experimentado episodios de sangrado, emparejados 1:2 por edad y sexo. Los polimorfismos analizados, seleccionados de acuerdo con precedentes existentes en trabajos de nuestro propio grupo o en la literatura que invitaban a estudiarlos en este contexto, fueron los siguientes: c.430C>T y c.1075A>C del citocromo P-450 2C9, -1639G>A de la vitamina K epóxido reductasa (VKORC1), a29809g de la calumenina, C609T de la NAD(P)H:quinona oxidoreductasa, A503V de la P450 óxidoreductasa y V433M del citocromo P-450 4F2. Asimismo, quisimos ver si la ingesta de antiarrítmicos (amiodarona) o antiácidos (omeprazol, ranitidina) se asociaba con el incremento de riesgo de hemorragia gastrointestinal grave en estos pacientes. Estudiamos además si la interacción entre varios de estos factores podía incrementar el riesgo hemorrágico.

#### Polimorfismos y dosis extremas de acenocumarol

Se estudiaron las dosis de acenocumarol que requirieron 9.538 pacientes de los hospitales: Morales Meseguer (Murcia), Juan Canalejo (Coruña) y Universitario (Salamanca), para lograr una anticoagulación correcta (INR en el rango apropiado). En nuestro centro realizamos las determinaciones genéticas de los pacientes que requirieron dosis extremas del anticoagulante, bajas [≤ 5 mg/semana (percentil 5), n = 83 tras descartar a los que no cumplían criterios de inclusión o en los que no se pudo genotipar] o altas [≥ 30 mg/semana (percentil 95), n = 203 tras los descartes].

## RESULTADOS

### Acenocumarol y hemorragia digestiva

Los resultados se recogen en detalle en el artículo que publicamos en *British Journal of Haematology*<sup>(2008; 143: 727-33)</sup> con motivo de este estudio. A modo de resumen, cabe resaltar que individualmente, ninguno de los polimorfismos constituyó un factor de riesgo de hemorragia digestiva severa. Sin embargo, cuando los pacientes portaban al menos uno de los polimorfismos siguientes: c.-1639G>A de VKORC1, c.430C>T o c.1075A>C de CYP2C9, y además cumplían simultáneamente uno de los siguientes requisitos: do-

sis de acenocumarol semanal > 15 mg, consumo de amiodarona o consumo de aspirina, en tales situaciones presentaban mayor riesgo de hemorragia gastrointestinal [riesgos relativos (RR) de 4,19 (IC95% 1,59-11,04), 9,97 (IC95% 1,75-56,89) y 8,97 (IC95% 1,66-48,34) respectivamente]. Finalmente, el consumo de estatinas se asoció per se con una reducción del riesgo hemorrágico [RR 0,50 (IC95% 0,26-0,99)].

### Polimorfismos y dosis extremas de acenocumarol

Los resultados se recogen en detalle en el artículo que publicamos en *Journal of Thrombosis and Haemostasis*<sup>(2010; 8: 1012-7)</sup> con motivo de este estudio. Los siguientes polimorfismos: c.-1639G>A de VKORC1, c.1075A>C de CYP2C9 y V433M del citocromo P-450 4F2, tenían un efecto importante en el requerimiento de dosis extremas: sólo uno de los 203 pacientes (0,5%) que necesitaron dosis altas de acenocumarol portaba el genotipo AA de c.-1639G>A de VKORC1, mientras que sí lo portaban 45 de los 83 (54%) que necesitaban dosis bajas. Por otro lado, sólo 14 de los 203 pacientes (7%) que tomaban dosis altas portaban el alelo C de c.1075A>C de CYP2C9, por 46 de un total de 83 (56%) que tomaban dosis bajas, que sí lo llevaban. Además, se encontraron resultados interesantes con el polimorfismo V433M del citocromo P-450 4F2: sólo 6 de los 83 pacientes (7%) que necesitaban dosis bajas presentaban el genotipo MM, por 55 que lo portaban de los 203 individuos (27%) del grupo de dosis altas; el genotipo VV aparecía en 39 (48%) de los 83 pacientes de dosis bajas mientras que sólo aparecía en el 25% (51 individuos de un total de 203) del grupo de dosis altas.

## CONCLUSIONES

La conclusión práctica derivada de esta investigación es que el conocimiento de determinadas características genéticas de los pacientes que se van a someter a tratamiento anticoagulante oral con acenocumarol puede resultar de interés a la hora de valorar los riesgos asociados con la citada terapia, muy especialmente en los casos en los que no es posible ajustar el INR empleando las dosis habituales de anticoagulante. Dicho conocimiento cobra mayor relevancia si el paciente se va a ver sometido a otros tratamientos farmacológicos simultáneamente.