

Validación de una encuesta y análisis de la calidad de la atención al final de la vida en el Hospital de Navarra

K. Martínez, I. Osés, B. Bermejo

Hospital de Navarra. Pamplona.

La muerte y especialmente la muerte de un ser querido representan un tiempo centinela –un tiempo que cuestiona en profundidad y de verdad la capacidad del sistema de salud para proporcionar una atención médica compasiva y coordinada.

Cuatro elementos clave constituyen la atención centrada en el paciente y la familia, de manera especial al final de la vida. Los profesionales y las instituciones de atención a la salud deben:

1. Proporcionar el confort físico y el apoyo emocional deseado.
2. Promover la toma compartida de decisiones.
3. Tratar a cada paciente como una individualidad entendiendo sus necesidades y expectativas.
4. Atender las necesidades que las personas que cuidan y aman al paciente terminal.

Escuchar lo que las personas gravemente enfermas y sus seres queridos dicen es clave para examinar si las instituciones proporcionan una atención médica centrada en el paciente y la familia. El cuestionario que se ha validado pretende proporcionar a la institución hospitalaria instrumentos de medida para capturar sus perspectivas dado que pregunta a los familiares de pacientes fallecidos cuestiones generales y concretas sobre los cuatro campos mencionados.

La creciente implicación de la opinión del propio paciente en las decisiones médicas ha creado la necesidad de medir los resultados de formas más ricas que la simple eficacia o seguridad. Así, por ejemplo, la evaluación de la calidad de la asistencia, tal y como la perciben los pacientes o sus familiares, es una variable fundamental de lo que se conoce, en esta nueva óptica, como evaluación de resultados.

Para evaluar dichos resultados se ha validado, mediante los métodos y pasos al uso, un cuestionario ideado por la profesora Joan Teno. El proceso de adaptación cultural del cuestionario ha consistido en tres fases principales:

- Traducción al castellano por dos traductores.
- Retro-traducción al idioma original por dos traductores distintos.
- Prueba en un grupo reducido de pacientes.

En la validación de un cuestionario, los aspectos fundamentales son la factibilidad, la validez y la fiabilidad. El cuestionario traducido al castellano y adaptado a nuestro medio hospitalario ha demostrado cumplir estos tres requisitos.

El objetivo último de los cuestionarios de calidad no es únicamente conocer la calidad de la asistencia en un momento determinado, sino que constituyen el punto de partida para el desarrollo de intervenciones que puedan mejorar esta calidad de la asistencia.

El cuestionario se pasó mediante entrevista telefónica a los seres queridos más próximos a los pacientes fallecidos en el Hospital de Navarra a lo largo del año 2006. No se incluyeron en la muestra a las siguientes personas:

- pacientes menores de 18 años de edad
- familiares menores de 18 años de edad
- familiares de pacientes que fallecen a resultados de autolisis.

El primer contacto se hizo mediante una carta personalizada enviada a dicho familiar anunciándole la realización del estudio y la invitación a participar en el mismo. Se consiguió consentimiento informado de cada participante y se les afirmó su derecho a rechazar participar en el estudio así como se les aseguró la privacidad y la confidencialidad de los datos.

El número de personas entrevistadas fue 327. De los 712 fallecidos en el Hospital de Navarra durante el año 2006 que cumplían los requisitos para que sus familiares fueran entrevistados, no pudieron ser localizados 320 (44,94%) y otros 65 (9,12% del total; 19,87% del porcentaje válido) se negaron a ser entrevistados y cumplimentar el cuestionario. El porcentaje de cuestionarios completados fue, pues, de 45,92% y la tasa de respuesta de 83,41%.

La valoración global de la atención general al paciente terminal es de 7,91 (con un 11,9% que la puntúa con un 5 o menos). Este es un dato que se repite en todas las encuestas de calidad: Las personas valoran positivamente todo lo que se hace por ellas. Los problemas sólo surgen cuando se les pregunta por cuestiones concretas o se les deja hablar en respuesta a preguntas abiertas.

La puntuación que recibe la ayuda emocional para los familiares es la más baja de todas: 6,08 (con un 32,9% que la valora con un 5 o menos). Este dato requiere un análisis profundo mediante el estudio hermenéutico de las aportaciones libres de los entrevistados en las dos preguntas abiertas del cuestionario.

Se constata un desconocimiento absoluto del derecho a las voluntades anticipadas en la población entrevistada. Este dato lleva consigo la necesidad de trabajar este campo ético y legal no sólo entre y para los profesionales sino también para la población gen-

eral que desconoce en grado sumo la existencia de este derecho.

El ítem "información-comunicación" recibe una valoración de 7,61, pero los resultados obtenidos apuntan a necesidades de mejora en la comprensibilidad de la información, su cantidad y frecuencia, así como en la muestra de interés por las opiniones de pacientes y familiares.

El conocimiento de estas conclusiones no debe quedarse en el nivel del conocimiento sino que debe ser un acicate tanto para las instituciones sanitarias como para los profesionales de cara a intervenir en los puntos débiles del sistema y tomar las medidas pertinentes para la mejora de la calidad de la atención al final de la vida.

Análisis del osteosarcoma pediátrico mediante arrays de expresión

A. Patiño

Departamento de Pediatría. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

Fundamento: El osteosarcoma es el tumor óseo maligno más frecuente de la infancia y adolescencia y se origina predominantemente en los huesos largos de las extremidades. El tratamiento estándar del osteosarcoma de alto grado sitúa la supervivencia de pacientes con tumores no metastásicos en 65-70%.

Si bien los factores relacionados con la supervivencia, tales como la presencia de enfermedad metastásica y el grado histológico de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante, están bien definidos, la etiología exacta de este tumor pediátrico es ampliamente desconocida; hay pocas o ninguna alteración genética que se encuentre presente en la mayoría de los tumores y la frecuencia de las alteraciones detectadas generalmente varía entre los diferentes estudios en función del diseño o de los casos incluidos.

Aproximadamente 70% de los osteosarcomas presentan cariotipos alterados, siendo la ganancia del cromosoma 1, pérdida del 9, 13 y 17 y las alteraciones estructurales que afectan a los cromosomas 11, 19 y 20 las aberraciones más frecuentes. Existen diferentes alteraciones en vías moleculares que han sido relacionadas al desarrollo del osteosarcoma infantil, a la quimiorresistencia y al desarrollo de metástasis; por ejemplo los factores de crecimiento de la familia WNT o Her-2/neu, citoquinas (CXCR4), proteínas implicadas en la apoptosis (Fas, FasL, IL-12 e IFN- γ) y factores de transcripción (runx5).

En la actualidad, la mayor parte de los trabajos que exploran la utilidad de los *microarrays* en osteosarcomas se han realizado con líneas celulares comerciales, en general con una notoria ausencia de tejidos primarios humanos y de adecuados grupos de control con fines comparativos.

Basándose en la hipótesis de que un mejor conocimiento de la etiología genética de este tumor pediátrico y de las vías moleculares implicadas en su desarrollo podrían aportar datos útiles para su diagnóstico

y poseer valor pronóstico, los autores han realizado un estudio de genoma completo (GeneChip HG-U133A, Affymetrix) de osteosarcomas infantiles y huesos normales pareados, validando los posibles candidatos en un sistema de alto rendimiento en una serie más amplia de pacientes y tejidos.

Material y métodos. Las muestras de osteosarcomas primarios se obtuvieron mediante biopsia con aguja de 7 osteosarcomas de alto grado previa al inicio del tratamiento antitumoral, y las muestras de hueso pareado normal se recogieron en el momento de la resección tumoral. De cada muestra se obtuvo *in vitro* una línea celular en medio α MEM, mantenida a 37 °C en una atmósfera con CO₂ 5%. Todos los experimentos se realizaron con células osteoblásticas normales (N) de pase #1 y tumores (B) de pase #20 en el momento en que alcanzaban confluencia de 90% y en fase logarítmica de crecimiento.

Todas las muestras, normales y tumorales, fueron extraídas, teñidas y diagnosticadas por un patólogo especializado en los tejidos de estirpe ósea y se testaron para la expresión de fosfatasa alcalina, que es característica de las células de estirpe osteoblástica. Otros genes marcadores del linaje osteoblástico se determinaron mediante RT-PCR: osteopontina, sialoproteína ósea y osteocalcina. El fenotipo tumoral se definió por alteraciones en los exones 5-9 del gen TP53, LOH en VNTR en el intrón 1 de TP53; LOH de en VNTRs en intrones 2 y 20 de RB1 y estudio de la proliferación mediante ensayo MTT en ausencia de suero en el medio y en presencia de VP-16.

Se aisló ARN total de las 7 líneas tumorales y 7 normales pareadas, se retrotranscribió a ADNc y se hibridó en los chips HG-U133A de acuerdo a los protocolos de Affymetrix en colaboración con Progenika Biopharma S.A. Para validar los resultados obtenidos con los chips HG-U133A, se analizaron mediante tecnología TaqMan 96 genes en las 14 líneas celulares utili-

zadas previamente y 14 muestras adicionales (5 tejidos óseos normales, 4 tumores primarios y 5 metástasis pulmonares de osteosarcomas) utilizando el sistema 7900HT Micro Fluidic Card de Applied Biosystems. Los identificadores de las sondas diferencialmente expresadas entre osteosarcomas y huesos normales, así como sus valores de expresión se cargaron y analizaron en la aplicación *Ingenuity Pathways Analysis* (Ingenuity® Systems).

Resultados. Con el fin de asegurarse de que las líneas celulares derivadas conservaban las características del linaje osteoblástico, se determinó la expresión de genes marcadores de células osteoblásticas mediante RT-PCR semicuantitativa: colágeno α -1(I), osteopontina, sialoproteína ósea y osteocalcina, siendo los niveles de expresión comparables en células normales y tumorales. Con el fin de obtener evidencias de la naturaleza tumoral de las líneas de osteosarcomas, se analizaron los genes TP53 y RB1, detectándose mutaciones de TP53 en 2/7 muestras tumorales: delección hemicigota + mutación K132N en un caso y una delección hemicigota + mutación S241Y en el otro. Se detectó LOH afectando a RB1 en una de las muestras. El análisis de proliferación y apoptosis en presencia de etopósido y en ausencia de suero en el medio, mostró que ambas condiciones inducían muerte celular en células normales y tumorales, pero que las líneas tumorales eran significativamente más resistentes a la apoptosis, lo que habla a favor del mantenimiento de los fenotipos tumoral y normal, respectivamente, en nuestro modelo.

Se determinó el perfil de expresión del osteosarcoma infantil utilizando muestras pareadas procedentes de 7 pacientes afectados de osteosarcoma utilizando como soporte el *array* HG-U133A de Affymetrix. Los grupos de sondas se eligieron fijando un corte de FDR $<0,20$ calculado para el grupo junto con un valor de probabilidad $p < 0,0006$ para cada grupo individual de sondas. De este modo el número de grupos de sondas que mostraban una diferencia significativa era de 191, correspondientes a 172 genes. La correspondiente matriz de expresión para las 14 muestras se analizó utilizando un algoritmo de agrupamiento jerárquico que detecta similitudes entre las sondas basándose en su expresión.

Con el fin de confirmar el papel de los genes seleccionados en la carcinogénesis del osteosarcoma, se determinó la expresión de 96 genes seleccionados en un total de 28 muestras (14 líneas celulares utilizadas en los experimentos previos, 5 tejidos óseos normales, 4 tumores primarios y 5 tejidos de metástasis) mediante la tecnología TaqMan. Los resultados correspondientes a los genes que se validaron ($p < 0,05$) o aquellos que mostraban una tendencia a estar implicados en el modelo ($p = 0,05 - 0,09$) se muestran en la tabla 1. La vía molecular preferentemente alterada en nuestro modelo (analizada en *Ingenuity Pathways*), con 19 genes de

los 26 componentes diferencialmente expresados, era la vía de regulación del crecimiento y proliferación celulares mediante Fas, IL1A e IGF2.

Discusión. Uno de los objetivos principales de este estudio era desarrollar un sistema que permitiese el estudio a gran escala y bajo diferentes prismas, del osteosarcoma infantil. Las principales dificultades de este trabajo han sido la obtención de la muestra normal para el estudio comparativo y la demostración de que las líneas osteoblásticas expandidas *in vitro* a partir de osteosarcomas conservaban su fenotipo tumoral. Respecto a la obtención de hueso normal, el problema ético y metodológico de pinchar el hueso sano de un menor al diagnóstico se solventó obteniendo la muestra en la resección tumoral. Si bien se podría argumentar que las semanas de quimioterapia neoadyuvante pueden haber modificado la expresión génica de la muestra obtenida, este riesgo está justificado por disponer de una muestra de la misma estirpe que la muestra problema y que los "falsos positivos" debidos al efecto del tratamiento serían menos que los detectados al comparar el hueso tumoral con, por ejemplo, ARN extraído de sangre periférica. En cuanto a la validación del fenotipo tumoral, se dispone de diversas pruebas indirectas, si bien concluyentes, sobre la naturaleza tumoral de las muestras: la presencia de alteraciones en genes implicados en el desarrollo de tumores (TP53 y RB1) y que las líneas tumorales eran significativamente más resistentes a la apoptosis y proliferaban más que las normales. Finalmente, el hecho de que en el mapa de expresión, mediante un análisis no supervisado, se agrupen los tumores y normales independientemente (alta homogeneidad intragrupo y alta heterogeneidad intergrupo) avala la técnica de obtención y el mantenimiento de las líneas tumorales y normales.

En el análisis comparativo pareado entre muestras tumorales y normales se detectaron 172 genes diferencialmente expresados y que, por tanto, podían considerarse candidatos en el modelo de carcinogénesis del osteosarcoma infantil. Mediante la tecnología de *Fluidicards* (placas de 96 pocillos en cada uno de los cuales se sitúa un ensayo de *real-time* PCR que interroga un gen) se comprobó que únicamente 54 (58%) resultaron validados, lo que indica claramente que los resultados obtenidos en los *arrays* de expresión deben ser validados en series más extensas y/o mediante técnicas alternativas (basadas en el estudio de proteínas) antes de ser considerados candidatos fiables o estudiar su aplicación en la práctica clínica.

Como conclusión principal de este trabajo se podría decir que el modelo aquí presentado es útil para el estudio de genómica del osteosarcoma infantil y que probablemente pueda ser aplicado con éxito a otro tipo de enfermedades pediátricas de incidencia y disponibilidad de muestra escasas.

Tabla I. Genes validados mediante el sistema *TaqMan Low Density Array* por encontrarse diferencialmente expresados entre los osteosarcomas infantiles y los huesos normales pareados.

Probe set ID	Ensayo TaqMan	Gen	Probabilidad	Cambio (veces)
214782_a	Hs00193322_m1	CTTN	0.0029399	1,46804213
200685_a	Hs00191108_m1	SFRS11	0.0029399	1,72636343
206187_a	Hs00168765_m1	PTGIR	0.00285112	6,026545121
205105_a	Hs00153007_m1	MAN2A1	0.00291759	2,548761719
200668_s_a	Hs00704312_s1	UBE2D3	0.00291759	1,713614676
218026_a	Hs00260235_m1	HSPC09	0.00155396	1,500220167
207708_a	Hs00267829_m1	MOXD1	0.00155396	11,3201608
203221_a	Hs00220768_m1	TLE1	0.00155396	2,61702765
218517_a	Hs00268739_m1	PHF17	0.001358885	2,63744326
204487_a	Hs00175188_m1	CTSC	0.00159494	5,34766609
201578_a	Hs00193638_m1	PODXL	0.002281937	49,59385486
202410_x_a	Hs00171254_m1	IGF2	0.002408289	0,359772101
221901_a	Hs00286734_m1	KIAA1644	0.002548276	0,362181756
201701_s_a	Hs00175051_m1	PGRMC2	0.002548276	2,221376566
213885_a	Hs00197678_m1	TRIM3	0.002548276	1,43010258
206702_a	Hs00176936_m1	TEK	0.002967106	11,76262274
215029_a	Hs00260790_m1	FLJ12666	0.002938529	1,37482862
221586_s_a	Hs00231022_m1	E2F5	0.004627899	0,674930521
200745_s_a	Hs00181845_m1	GNB1	0.005345677	1,370265751
213517_a	Hs00245320_m1	PCBP2	0.00616252	1,58132432
210648_x_a	Hs002601001_m1	SNX3	0.007030101	1,801596839
222282_a	Hs00406243_m1	PAPD4	0.008141164	1,301731654
22092_a	Hs00224081_m1	EBF2	0.008386184	13,6389979
213935_s_a	Hs00213263_m1	TRA2A	0.009225885	1,468025873
205803_s_a	Hs002608195_m1	TRPC1	0.009225885	1,52793609
215588_x_a	Hs00187143_m1	R1OK3	0.01057042	1,60026478
201722_s_a	Hs00234919_m1	GALNT1	0.01217962	0,60223883
208210_a	Hs00174022_m1	IL1A	0.01282694	18,93156157
213015_a	Hs00223117_m1	BBX	0.013875779	1,60893932
208881_s_a	Hs00187805_m1	DMD	0.015776756	4,90129267
212672_a	Hs00178892_m1	ATM	0.01790128	1,544515736
213791_a	Hs00175049_m1	PENK	0.019172485	0,319575108
212422_s_a	Hs002602119_m1	JMJD2B	0.020276498	1,38280467
200769_s_a	Hs00282815_g1	MAT2A	0.022919857	1,46830128
205518_s_a	Hs002679137_m1	CMAH	0.025783871	3,722353423
35436_a	Hs00266695_m1	GOLGA2	0.02585758	1,32600197
20181_x_a	Hs00177301_m1	SRPK2	0.02585758	2,2509113
206678_s_a	Hs002602254_s1	PRKC1	0.029115421	1,16522977
204471_a	Hs00176645_m1	GAP43	0.02808894	0,79492258
220046_s_a	Hs00223199_m1	CCNL1	0.032220485	1,847754301
207365_x_a	Hs00733822_m1	WDR45	0.034900774	1,58803929
207186_s_a	Hs00189461_m1	FALZ	0.04500945	1,763252797
210407_a	Hs00221372_m1	PPM1A	0.04500945	1,432425111
208620_a	Hs00262410_s1	PCBP1	0.05691342	1,29470252
205522_a	Hs00262605_m1	HOXD4	0.067120717	1,99206887
206472_s_a	Hs00183222_m1	TLE3	0.070213707	0,77893085
204341_a	Hs00414879_m1	TRIM16	0.070213707	0,836384531
215404_x_a	Hs00241111_m1	FGFR1	0.077714183	1,483569302
208502_s_a	Hs002657528_m1	PITX1	0.091651873	0,913522168

Proteólisis mediada por la proteína C-reactiva: Análisis genómico e implicaciones en aterotrombosis.

J. Orbe

Fundación para la Investigación Médica Aplicada. Pamplona.

FUNDAMENTO

La proteína C reactiva (CRP) se ha considerado en los últimos años como el marcador inflamatorio de riesgo cardiovascular más importante, tanto en sujetos aparentemente sanos, como en aquellos con antecedentes de enfermedad coronaria. Sin embargo, se desconoce si su elevación en plasma es consecuencia del proceso aterotrombótico o si, por el contrario, está directamente implicada en su patogénesis, y algunas de sus acciones pueden ser atribuidas a un efecto directo sobre la pared vascular.

La hipótesis de nuestro trabajo se basa en que la CRP, además de biomarcador del proceso inflamatorio relacionado con la aterosclerosis, ejerce acciones directas sobre los elementos celulares presentes en las placas de aterosclerosis, hecho que puede ser relevante en el diagnóstico y prevención de los síndromes clínicos debidos a la ruptura de placas de aterosclerosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudios in vitro. Las células endoteliales (HUVEC) se obtuvieron por digestión con colagenasa A y se estimularon en presencia o ausencia de CRP (50 µg/mL, Calbiochem) durante 12 h. El RNA aislado (Tripure y RNeasy, Qiagen) se hibridó con el GeneChip U133A y los arrays se scanearon y se analizaron con el Microarray Suite (Affymetrix). El análisis bioinformático de los grupos de función se realizó con el TMeV y el Garban. Los resultados obtenidos en el array, se validaron mediante RT-PCR en tiempo real (ABI Prism 7000 SDS) con ensayos de expresión génica (Applied Biosystems) utilizando GAPDH como control interno. Además se confirmaron los resultados del array a nivel de proteína mediante western blot, y se analizó la actividad MMPs mediante sustrato fluorogénico. Por último se estudió las vías de las MAPquinas como las posibles señales intracelulares implicadas en la inducción de MMP-1 y MMP-10 por CRP.

Pacientes. Se estudiaron 400 sujetos aparentemente sanos y se realizó una evaluación del riesgo cardiovascular global. Además se les midieron parámetros inflamatorios (CRP, fibrinógeno, IL-6 y factor Willebrand) y proteolíticos (MMP-1, -9, -10 y TIMP-1) así como el espesor íntima-media carotídeo. Ninguno de ellos presentaba enfermedad aterosclerótica vascular. Los criterios de exclusión fueron: alteración severa de la función renal, enfermedades inflamatorias crónicas y administración de antiinflamatorios, antitrombóticos, o terapia hormonal en las 2 semanas previas. Los pacientes con infección aguda, según criterios clínicos, también fueron excluidos.

Finalmente, en placas ateroscleróticas avanzadas de pacientes sometidos a endarterectomía carotídea

(n=15) se analizó la expresión de MMP-1, MMP-10 y CRP, utilizando arterias mamarias como control (n=20).

Análisis estadístico. Las diferencias entre cultivos control o estimulados se analizaron con el test de Mann-Whitney. Las asociaciones entre niveles de MMP-10 y los factores de riesgo de ateroesclerótico se realizó mediante test de correlación de Pearson o t-Student. Posteriormente, se empleó el análisis multivariante y se calculó la odds ratio (ORs) para la asociación de EIM y terciles de MMP-10. El análisis se realizó en SPSS 11.0.

RESULTADOS

Asociación CRP y MMP-10 en células endoteliales. La CRP aumentó significativamente los niveles de expresión secreción y actividad de MMP-1 y MMP-10 en HUVEC (Fig. 1). El aumento de la expresión de estas metaloproteasas por CRP implicó las vías de transducción de las MAPKs.

MMP-10 y factores de riesgo cardiovascular. De los pacientes (n=400) analizados el 81 % eran dislipémicos (el 34,2 % recibían hipolipemiantes), el 50,7 % eran hipertensos (el 42,8 % con terapia antihipertensiva), el 32 % eran obesos, el 29,5 % fumadores y el 16 % diabéticos (el 62,5 % con antidiabéticos). Los niveles medios circulantes de MMP-10 en la población eran de 664,7 pg/mL, mostrando a un amplio rango de distribución (112,6-1941,7 pg/mL). Las correlaciones entre los niveles de MMP-10 y los factores de riesgo de ateroesclerótico se muestran en la Tabla 1. MMP-10 se asoció significativamente con la edad y con el índice de riesgo PROCAM y estaba más elevada en diabéticos y fumadores. Además, la MMP-10 correlacionó positivamente con fibrinógeno y hs-CRP pero no con IL-6, y con otras MMPs, como MMP-1 y -9. Cabe resaltar, además, que los niveles de MMP-10 en sujetos con estatinas, antihipertensivos y antidiabéticos fueron similar a aquellos sin medicación.

La MMP-10 mostró una correlación positiva con el EIM carotídeo en la población total, no observada para MMP-1 y -9. En el análisis de regresión múltiple, la asociación entre MMP-10 y el EIM permaneció significativa ($p=0,015$) tras el ajuste para edad y sexo, otros factores de riesgo ateroesclerótico, marcadores inflamatorios, y tratamientos. Además el EIM carotídeo fue mayor en el tercil superior de MMP-10 en relación al medio ($0,80\pm 0,25$ vs $0,73\pm 0,20$ mm, $p < 0,05$) y al tercil menor ($0,70\pm 0,16$ mm, $p < 0,01$); además, la diferencia persistió tras ajustar por factores de riesgo ateroesclerótico tradicionales y marcadores inflamatorios (OR ajustada 6,3, $p=0,024$).

Inmunolocalización de CRP, MMP-1 y MMP-10 en arterias humanas. Finalmente, se observó una intensa señal para estas proteínas en las lesiones carotídeas avanzadas, mientras que la señal fue débil en las arte-

rias mamarias control. La tinción más intensa se dio en las zonas ricas en macrófagos de la placa aterosclerótica, y en la monocapa endotelial.

CONCLUSIONES

En el presente estudio hemos demostrado que la proteína C-reactiva (CRP), marcador y mediador inflamatorio en el proceso aterosclerótico, es capaz de inducir la expresión y activación de la MMP-10 *in vitro*, en CE humanas e *in vivo* en una serie de sujetos sin enfermedad cardiovascular, ya que existía asociación entre los niveles circulantes de CRP y MMP-10 y un

marcador de aterosclerosis subclínica (espesor-intima media carotídeo) independiente de factores de riesgo aterosclerótico tradicionales, marcadores inflamatorios (fibrinógeno, hs-CRP y FvW) y tratamiento antiaterosclerótico. Además hemos descrito la presencia de la MMP-10 en la placa de ateroma, donde colocalizó con la CRP en macrófagos y endotelio. Por tanto, la CRP no es solamente un marcador sino también un factor proaterogénico y regulador de la biología de la placa a través de la proteólisis endotelial, proporcionando un nexo entre inflamación y crecimiento e inestabilidad de la placa.

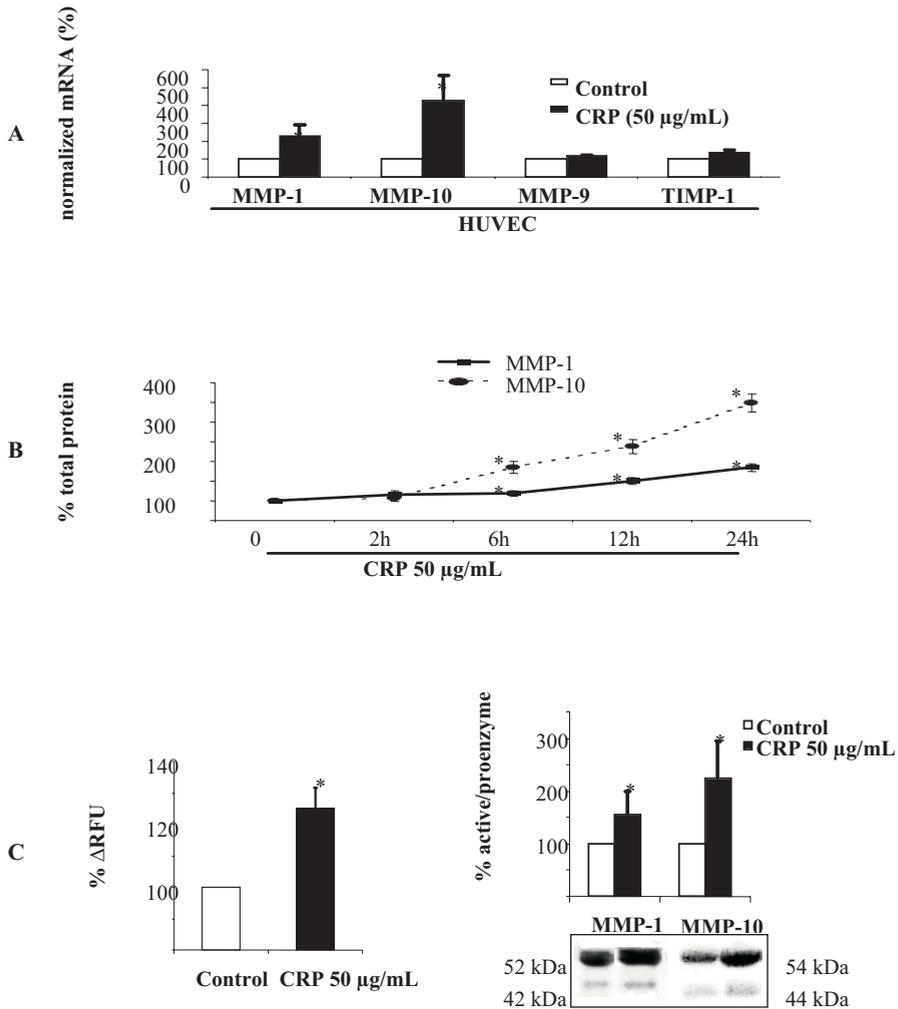


Figura 1. La CRP incrementa A) el RNA mensajero de la MMP-1 y MMP-10 en células endoteliales humanas sin alterar la expresión de MMP-9 y TIMP-1; B) la secreción de MMP-1 y MMP-10 a partir de las 6 h y hasta las 24 h en relación al control; C) la actividad de MMPs medida por sustratos fluorogénicos. D) Western blot representativo de MMP-1 y MMP-10 y análisis densitométrico correspondiente al incremento forma activa/zimógeno tras estimulación con CRP. *p<0.05 respecto al control. RFU= Unidades relativas de fluorescencia.

Tabla 1. Asociación de los niveles de MMP-10 con factores de riesgo aterosclerótico

	r or Media±DS	P
Edad, años	0,10	0,136
Sexo, hombres/mujeres	701,5±334,1/648,7±292,1	0,247
IMC, kg/m ²	0,07	0,218
Hipertensión, yes/no	682,1±319,5/694,2±329,5	0,758
Tratamiento, si/no	747,3±300,5±686,4±327,0	0,456
PAS, mm Hg	0,05	0,365
PAD, mm Hg	-0,04	0,501
Diabetes mellitus, si/no	762,9±320,4/674,6324,0	0,050
Tratamiento, si/no	746,6±329,8/681,1±323,7	0,284
Glucosa, mg/dL	0,09	0,135
Dislipemia, si/no	694,1±322,9/659,5±335,2	0,523
Tratamiento, si/no	717,4±341,0/685,1±322,7	0,551
Estatinas, si/no	701,4±337,3/688,3±323,9	0,817
Colesterol-total, mg/dL	0,02	0,749
Triglicéridos, mg/dL	0,01	0,850
Colesterol-HDL, mg/dL	-0,15	0,014
Tabaquismo, si/no	783,8±383,8/648,5±287,6	0,005
Fibrinogeno, mg/dL	0,26	<0,001
Factor von Willebrand factor, %	0,09	0,138
hs-CRP, mg/dL	0,16	0,007
IL-6, pg/mL	0,09	0,144
Espesor máximo IMT-carotídeo, mm	0,17	0,005

Significado de la sobreexpresión del gen EVI1 y diseño de nuevas estrategias terapéuticas mediante siRNA (short interfering RNA) en pacientes con leucemia mieloide aguda

M. D. Otero

Centro para la Investigación Médica Aplicada (CIMA). Pamplona.

En los últimos años, el análisis genético ha aportado una información indispensable para el diagnóstico y pronóstico de la leucemia mieloide aguda (LMA). Sin embargo, a pesar de los avances realizados y del desarrollo de nuevas terapias, el porcentaje de pacientes que recaen es elevado. La supervivencia a los 5 años de los pacientes que presentan alteraciones genéticas asociadas con mal pronóstico es sólo de un 2%. El objetivo que nos planteamos en este proyecto fue caracterizar a nivel genético dos alteraciones que están asociadas a mal pronóstico en LMA: las reordenaciones 3q y la sobreexpresión del gen EVI1 (3q26). También nos propusimos estudiar el mecanismo de sobreexpresión de EVI1, un factor asociado a mal pronóstico en LMA

tanto en pacientes con reordenaciones 3q como con cariotipo normal, un grupo que representa más del 40% de todas las LMA.

Hemos comprobado que hay una gran heterogeneidad molecular en los pacientes con reordenaciones 3q, tanto en los puntos de rotura en estas regiones como en la expresión de los genes cercanos, y que GATA2 (3q21) está implicado en el mecanismo de transformación de la LMA con reordenaciones 3q, junto con EVI1. Por otra parte, hemos cuantificado la expresión de los distintos transcritos de EVI1 y de GATA2 en una serie amplia de LMA. Este estudio nos ha permitido comprobar la alta incidencia de sobreexpresión de GATA2 en LMA y definir subgrupos con un perfil gené-

tico diferente dentro de los grupos de pronóstico intermedio y desfavorable. Estos resultados nos llevaron a plantearnos la necesidad de caracterizar el grupo de LMA con cariotipo normal utilizando, además de técnicas moleculares, nuevas herramientas genéticas.

Hemos comprobado que el mecanismo implicado en la patogénesis de las LMA con sobreexpresión de EVI1 es complejo. Mediante siRNAs para inhibir EVI1 y GATA2, ensayos *in vitro* en líneas celulares que sobre-

expresaban estos genes, y el estudio del efecto que tiene esta inhibición mediante microarrays de expresión, hemos identificado un grupo de genes relacionados con EVI1 y GATA2. La importancia de GATA2 en el control de la diferenciación y proliferación mieloide, sugiere que su alteración podría ser una de los primeros eventos genéticos en el proceso de transformación a LMA.

Malformaciones vasculares venosas o mixtas de bajo flujo. Estudio morfológico mediante angio-TAC o angio-RM-3D, y biológico mediante parámetros que intervienen en la coagulación y angiogénesis

P. Redondo

FUNDAMENTO

Tradicionalmente, en el estudio de las malformaciones venosas extensas o combinadas tipo Síndrome de Klippel-Trenaunay (SKT) (definido por la tríada de nevus telangiectásico superficial, malformación vascular veno-linfática y osteohipertrofia de la extremidad afecta), se han empleado diferentes técnicas radiológicas, tanto invasivas como no invasivas. Con la llegada de nuevos aparatos tanto de tomografía computarizada como de resonancia magnética, es posible realizar estudios angiográficos de forma no invasiva. Aunque estas técnicas no han sido previamente valoradas, podrían ser de elección en el estudio de grandes malformaciones vasculares que se extienden e incluso sobrepasan una extremidad, ya que con una única exploración podría obtenerse la información diagnóstica y terapéutica necesaria, que antes habría sido necesario completar mediante la combinación de varias pruebas tanto invasivas como no invasivas.

Estudiar en estos pacientes de factores procoagulantes y proangiogénicos puede ayudarnos a complementar el diagnóstico radiológico y definir quiénes pueden beneficiarse de heparinas de bajo peso molecular para evitar un proceso trombótico y quiénes, ante la ausencia de otras opciones terapéuticas, podrían ser futuros candidatos a un tratamiento antiangiogénico específico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante un periodo de dos años, se estudiaron 31 pacientes con malformaciones vasculares extensas. La edad media fue de 30,5 años, 17 eran hombres y 14 eran mujeres. Once lesiones fueron diagnosticadas de malformaciones puramente venosas y las otras 20 de malformaciones combinadas tipo SKT. Se incluyeron pacientes con malformaciones de tamaño moderado-extenso que abarcaban al menos un 15% de la superficie corporal (equivalente al tamaño de una extremidad). Las lesiones fueron divididas en superficiales

cuando se limitaban a la piel y al tejido celular subcutáneo o infiltrantes cuando afectaban al músculo. Se realizó una venografía por tomografía computerizada multicorte (Somatom Volume Zoom, Siemens, Erlangen, Alemania) o una venografía por resonancia magnética en tres dimensiones (Magnetom Symphony Siemens, Erlangen, Alemania). Se obtuvieron un total de 60 muestras de suero recogidas de la vena cubital y de una vena local de la malformación antes de realizar el tratamiento con microespuma de polidocanol. Para los estudios de coagulación, se analizaron valores de número total de plaquetas, tiempo de protrombina, fibrinógeno y dímero-D. Se estudiaron los siguientes factores angiogénicos: factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) total, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R2, metaloproteinas (MMP)-2, MMP-9, angiogenina (ANG)-1, ANG-2, TIE-2, factor derivado de crecimiento de plaquetas (PDGF)-AB y PDGF-BB.

RESULTADOS

Las imágenes de superficie cutánea permitieron evaluar la localización y extensión del nevus capilar, así como demostrar la hipertrofia del miembro. Las reconstrucciones tridimensionales mostraron las variaciones y el origen y el curso de los vasos aberrantes determinando sus vías de drenaje (Fig. 1). Todos los pacientes presentaban venas embriológicas, ya fuesen venas laterales anómalas o venas ciáticas persistentes. Respecto a las anomalías del sistema venoso profundo, sólo un paciente presentó aplasia de todo el sistema en la extremidad afecta. Un paciente presentó aplasia de la vena femoral superficial y otros ocho hipoplasia; curiosamente, uno de ellos tenía una duplicación a ese nivel. Sólo la mitad de los pacientes presentaron una vena poplítea normal. Un paciente tenía una dilatación aneurismática en esa localización y en seis había aplasia de la poplítea. En dos pacientes observamos largas venas suprapúbicas de drenaje en la vena externa iliaca contralateral. Otros dos pacientes se manifestaron con aplasia o atresia de la vena

femoral de la extremidad afecta. Curiosamente, en los pacientes con un patrón geográfico del nevus telangiectásico (8 de 20), la mayor parte tenían hipoplasia o aplasia de la vena femoral y aplasia de la vena poplítea. Mientras que en los pacientes con un patrón segmentario (12 de 20), sólo uno tenía aplasia de la femoral y dos presentaban aplasia de la vena poplítea. Ninguno de los pacientes necesitó ningún otro examen radiológico complementario para confirmar el diagnóstico y planificar el tratamiento mediante escleroterapia.

Los niveles séricos de los factores angiogénicos y de la coagulación estudiados se exponen en la tabla 1. Los valores de VEGF y MMP-9 aumentaron en pacientes con malformaciones combinadas tipo SKT. Los niveles séricos de ANG-2 estaban elevados en malformaciones vasculares y se correlacionaban con los niveles de TIE-2, no así los niveles de ANG-1. También apreciamos una leve elevación de los valores de PDGF-BB en el grupo de malformaciones combinadas. La severidad de la coagulación intravascular localizada (Tabla 1), se correlacionó positivamente con el tamaño de la malformación vascular.

CONCLUSIONES

Las nuevas técnicas de angio-TAC y angio-RM en 3D son las pruebas de elección para estudiar las malformaciones venosas extensas y las malformaciones combinadas tipo SKT que afectan a una extremidad. Con una única exploración, además de valorar los tejidos

blandos y la anatomía ósea, somos capaces de estudiar los sistemas venosos superficial y profundo, así como el origen y localización de los vasos anómalos, esencial en la planificación terapéutica. El patrón geográfico de los nevus telangiectásicos en estos pacientes se ha relacionado con una mayor afectación linfática y un mayor número de complicaciones, en comparación con un patrón segmentario que tiene un curso más benigno. En este estudio hemos demostrado cómo la presencia de un patrón geográfico también es sugestivo de una hipoplasia y/o aplasia de las venas femorales y poplíteas.

La coagulación intravascular localizada que ocurre en asociación con malformaciones vasculares extensas, debe estudiarse de cara a instaurar un tratamiento profiláctico adecuado y evitar las complicaciones tromboembólicas tan frecuentes en estos pacientes.

Las malformaciones vasculares venosas y las combinadas de bajo flujo son lesiones hemodinámicamente inactivas, presentes desde el nacimiento, que van empeorando lentamente y creciendo durante toda la vida sin presentar en ningún momento signos de involución. La presencia de factores séricos proangiogénicos en la mayoría de los pacientes estudiados implica un teórico papel de la angiogénesis en la fisiopatología y evolución de las lesiones, y sugiere algunas posibles dianas terapéuticas en pacientes muy concretos con fármacos antiangiogénicos que ya se usan desde hace años en procesos oncológicos.



Figura 1. Pierna varicosa y reconstrucción tridimensional de las varicosidades.

Diseño de vectores poliméricos para la liberación controlada de factores neurotróficos tipo GDNF en modelos animales de enfermedad de Parkinson. Perspectivas terapéuticas

M.J. Blanco

Universidad de Navarra. Pamplona

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad degenerativa, lentamente progresiva caracterizada por temblor de reposo, cara inexpresiva, rigidez, lentitud al iniciar y practicar movimientos voluntarios. Neuropatológicamente se caracteriza por pérdida de células dopaminérgicas en la sustancia nigra lo cual conlleva déficit en el suministro de dopamina a nivel de ganglios basales.

Los factores de crecimiento nervioso, o factores neurotróficos, que respaldan la supervivencia, crecimiento y desarrollo de las células cerebrales, son un tipo de terapia prometedora para la enfermedad de Parkinson. Se ha demostrado que el GDNF, factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, protege las neuronas de dopamina y promueve su supervivencia en los modelos animales de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, la administración de proteínas en el cerebro no está exenta de dificultades, por ello, el sistema elegido para administrar el GDNF en el cerebro será uno de los puntos clave para el éxito del tratamiento. En este sentido, el uso de micropartículas formuladas a partir de polímeros biodegradables parece ser la estrategia más apropiada.

Por ello, en nuestro grupo de investigación hemos desarrollado un protocolo de expresión y purificación de GDNF (de rata y humano) en células eucariotas de mamífero. Una vez obtenido el GDNF puro el siguiente paso fue microencapsularlo en partículas biodegradables, utilizando un método original, desarrollado en nuestro departamento (TROMS). Tras la caracterización físico-química de las micropartículas y verificar que la proteína encapsulada era activa, las formulaciones seleccionadas fueron administradas en ratas tratadas unilateralmente con 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) para inducirles un cuadro parkinsoniano.

El comportamiento de las ratas fue estudiado tras la inyección intraperitoneal de 5 mg/Kg de anfetamina 2, 4 y 5 semanas tras la implantación de las micropartículas. Transcurrido este tiempo los animales fueron anestesiados y perfundidos a través del corazón con 0,9% suero salino seguido de 4% paraformaldehído en PBS pH 7.4 a 4°C. Posteriormente se realizaron secciones coronales del cerebro de un espesor de 30 micras y dichas secciones se recogieron sobre PBS-tiomersal 0,01% que fueron preparadas para realizar inmunohistoquímica en flotante.

El posterior análisis histológico se centró básicamente en la detección inmunohistoquímica de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) para valorar el grado de innervación estriatal y de GDNF para valorar la presencia/ausencia de GDNF en las micropartículas 5 semanas después de su inyección y para valorar la difusión del factor neurotrófico en el estriado.

En relación a los resultados de la TH se observaron grandes diferencias entre el hemisferio lesionado de las ratas que habían recibido micropartículas blancas o medio de dispersión de las micropartículas (grupo control) y aquellas ratas que habían recibido micropartículas de GDNF (Fig. 1). El grupo de animales que recibió micropartículas de GDNF mostró gran número de fibras TH positivas en el hemisferio tratado con GDNF y, en todos los animales, estas fibras dirigían sus neuritas hacia las micropartículas observándose mayor número de fibras en las zonas próximas al tracto de inyección y menor número de fibras en aquellas zonas alejadas del lugar de implantación de las micropartículas. En algunas regiones la densidad de estas fibras era suficiente como para reconstituir la estructura del estrioso. Las nuevas fibras TH positivas que aparecieron poseían tamaño y forma irregular pudiendo tratarse de un fenómeno de "sprouting" descrito por otros autores.

Por otro lado, 5 semanas después de la implantación, las micropartículas de GDNF eran todavía inmunoreactivas para GDNF, lo que permite afirmar que más de un mes después de la implantación de las micropartículas todavía puede observarse GDNF en el interior de éstas. También nos permite concluir que la formulación desarrollada permite, *in vivo*, la liberación del factor neurotrófico durante al menos 5 semanas. Este dato concuerda con las cinéticas de liberación realizadas *in vitro*. En cuanto a la difusión del GDNF pudimos observar difusión de la proteína en el estriado a lo largo del tracto de inyección de las micropartículas así como en las regiones adyacentes a éste.

En resumen, los resultados obtenidos nos permiten concluir que las micropartículas implantadas en el estriado de ratas parkinsonianas promueven la restauración del sistema dopaminérgico nigroestriatal y mejoran significativamente la función motora de dichos animales.

Esta estrategia abre nuevas posibilidades terapéuticas en la enfermedad de Parkinson.



Figura 1. Muestra de la tinción TH para (A) grupo control que ha recibido el medio de dispersión de las micropartículas, (B) grupo de animales que ha recibido las micropartículas de GDNF y (C) grupo de animales que ha recibido las micropartículas blancas. Obsérvense las diferencias que existen en el hemisferio lesionado entre el grupo control y el grupo que ha recibido micropartículas blancas y el grupo de ratas que ha recibido micropartículas de GDNF.

Aplicación de la técnica de fiction como herramienta en la detección precoz del cáncer de pulmón

M.I. Zudaire

Unidad de Carcinogénesis. Fundación para la Investigación Médica Aplicada. Pamplona.

FUNDAMENTO

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer en todo el mundo. Comparando con otros tumores, su elevada mortalidad es debida principalmente a la ausencia de procedimientos clínicos estandarizados para el diagnóstico de la enfermedad en estadios más tempranos y más tratables.

La broncoscopia es la exploración invasiva más útil para el diagnóstico del cáncer de pulmón. El estudio citopatológico de los lavados bronquiales obtenidos por broncoscopio resulta de gran utilidad ya que en él pueden ser detectadas células del tumor que han sido liberadas a lo largo de la carcinogénesis pulmonar. La utilización de técnicas complementarias como el estudio inmunocitoquímico y genético de marcadores tumorales podría mejorar la sensibilidad de la citología.

La técnica de FICTION consiste en la detección simultánea de antígenos celulares mediante inmunofluorescencia y de alteraciones cromosómicas mediante la técnica de FISH en un único experimento de hibridación. Es una técnica muy útil en muestras con una población celular muy heterogénea donde además el porcentaje de células tumorales es muy bajo, como es el caso de muestras de lavados broncoalveolares y esputos de individuos con cáncer de pulmón.

MATERIAL Y MÉTODOS

Mediante la técnica de FICTION han sido estudiados 63 lavados broncoalveolares pertenecientes a pacientes con un cáncer de pulmón visible por broncoscopia, lavados de pacientes con un tumor no visible y lavados control, pertenecientes a individuos sin cáncer de pulmón.

Tras optimizar la técnica de FICTION con diversos marcadores tumorales para el inmunofenotipaje, y distintos conjunto de sondas, el análisis de la serie se ha llevado a cabo utilizando la sobreexpresión de la proteína hnRNPA1 como marcador tumoral, y el conjunto de sondas comercial LAVysion para el análisis citogenético.

Además, el equipo investigador ha trabajado en el desarrollo de un sistema de análisis automatizado de la técnica de FICTION.

RESULTADOS

La técnica de FICTION mostró una elevada especificidad al no detectar células tumorales en ninguno de

los lavados control. En el grupo de los lavados pertenecientes a tumores visibles por broncoscopia, la técnica de FICTION presentó una sensibilidad similar a la del análisis citológico (55% vs. 60%). La combinación de ambas técnicas aumentó significativamente la sensibilidad de la detección hasta un 70%, puesto algunos lavados fueron positivos para el análisis de FICTION, pero no por citología y viceversa.

Sólo uno de los lavados pertenecientes a pacientes con tumores no visibles por broncoscopia fue positivo para la detección de células tumorales, tanto por FICTION como por citología. Estos resultados nos han obligado a reevaluar la calidad de las muestras utilizadas y en la actualidad se está trabajando con una serie de esputos de gran calidad para validar la técnica de FICTION en este tipo de muestras.

El sistema automatizado desarrollado es capaz de detectar las células positivas para el marcaje con hnRNP A1 a 20 aumentos, identificar las células aisladas y los conjuntos de células agrupadas, para posteriormente segmentarlas, enumerar el número de señales de las 4 sondas presentes en el kit LAVysion, y tras la aplicación de un algoritmo de deconvolución, llevar a cabo una reconstrucción tridimensional de las imágenes similar a la obtenida en 3 dimensiones con un microscopio confocal.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la técnica de FICTION es una herramienta útil para el estudio de lavados broncoalveolares de pacientes con cáncer de pulmón. Con el marcador inmunofenotípico y el conjunto de sondas seleccionado hemos conseguido mejorar ligeramente el diagnóstico citológico de los lavados, por lo que consideramos que es de interés seguir trabajando en este campo estudiando la posibilidad de introducir nuevos marcadores y nuevas sondas. El desarrollo del sistema automatizado de análisis es especialmente prometedor, ya que podrá llevar a cabo el análisis citogenético con una mayor sensibilidad y rapidez. Nuestros datos, además, demuestran claramente, que la técnica FICTION se puede aplicar a muestras citológicas relacionadas con tumores sólidos y abre la puerta a su utilización en otros contextos diagnósticos que utilicen muestras citológicas de un amplio espectro de neoplasias epiteliales.

