

## Identificación de marcadores genómicos con valor pronóstico en pacientes diagnosticados de carcinoma de pulmón en estadio temprano mediante microarrays de single nucleotide polymorphisms (SNPs)

I. Zudaire<sup>1,2</sup>, A. Orta<sup>1</sup>, R. Pio<sup>1,3</sup>, A. Gúrpide<sup>4</sup>, D. Blanco<sup>1,5</sup>, M. Ortiz-Estevez<sup>6</sup>, A. Aramburu<sup>6</sup>, A. Rubio<sup>6</sup>, L.M. Montuenga<sup>1,5</sup>

1. Laboratorio de Biomarcadores. Área de Oncología. Fundación para Investigación Médica Aplicada.
2. Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Navarra.
3. Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Navarra.
4. Departamento de Oncología. Clínica Universidad de Navarra.
5. Departamento de Histología y Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.
6. Grupo de Bioinformática, CEIT y TECNUN, Universidad de Navarra.

En la actualidad, el cáncer de pulmón constituye la primera causa de muerte por cáncer en todo el mundo. A pesar de los enormes esfuerzos realizados para la mejora del diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad, su tasa de mortalidad continúa siendo elevada, principalmente debido a que el diagnóstico de esta neoplasia se realiza en los estadios más avanzados, donde las terapias resultan poco eficaces.

La resección quirúrgica completa es el tratamiento de elección en los estadios iniciales, consiguiendo una supervivencia a los cinco años de alrededor de un 60%. Sin embargo, un porcentaje de estos pacientes recaen. Con el fin de mejorar esta supervivencia se han llevado a cabo estudios aleatorizados valorando el beneficio de administrar a los pacientes radioterapia y/o quimioterapia adyuvante tras la cirugía. Estos trabajos han demostrado el beneficio del tratamiento adyuvante para los estadios II y III, no recomiendan el tratamiento de los pacientes con estadio IA, y hay opiniones discrepantes acerca del tratamiento en los pacientes de estadio IB. Hasta la fecha no se conoce el modo de definir de forma prospectiva el pronóstico de los pacientes de estos grupos, lo que pone de manifiesto la necesidad de encontrar marcadores biológicos que puedan predecir la recaída y definir el perfil de aquellos más agresivos que pueden beneficiarse del tratamiento adyuvante.

En este contexto, el objetivo de nuestro trabajo ha sido la búsqueda de un perfil pronóstico que permita clasificar de forma más eficiente a los pacientes con carcinomas de pulmón en estadios iniciales, utilizando la tecnología de arrays de SNPs.

Para llevar a cabo este proyecto se han analizado muestras tumorales pertenecientes a un to-

tal de 81 pacientes diagnosticados de carcinoma de pulmón de células no pequeñas de tipo histológico, adenocarcinoma y carcinoma escamoso, de estadio IA y IB. Se seleccionaron pacientes sin tratamiento ni anterior ni posterior a la cirugía y con un seguimiento mínimo de 4 años. De cada paciente se obtuvieron los datos correspondientes a sexo, edad, estatus tabáquico, estadio del tumor, tipo histológico, presencia o no de recidiva, estatus del paciente, tiempo a progresión y supervivencia global.

Para estudiar el perfil genómico de cada muestra, el DNA obtenido por microdissección de los tumores congelados fue hibridado en los arrays de la plataforma Affymetrix GeneChip® Human Mapping 500K Array Set. El análisis bioinformático posterior se realizó en R utilizando el paquete de análisis *aroma*. *Affymetrix*. La estimación del número de copia de cada alelo se llevó a cabo mediante NSA con BER, y se utilizó el algoritmo CBS para la segmentación de los datos. Los valores de  $\log_2$ ratio han sido además corregidos por celularidad y polisomía. El análisis de la LOH se llevó a cabo mediante un algoritmo propio. Las alteraciones descritas en nuestra serie son muy similares a las presentadas en trabajos previamente publicados: En carcinoma escamoso, las regiones más frecuentemente amplificadas fueron 3q26.32, 3q29, 8p12, 11q13.2, 9p13.3 y 8p11.21, y las regiones más frecuentes delecionadas fueron 3p26.3, 5q33.1, 3p12.1, 13q13.1 y 9p21.3. En adenocarcinomas, las regiones más frecuentemente amplificadas fueron 8q24.21, 14q13.3, 17q25.3 y 1q21.2. Encontramos algunas diferencias entre las regiones más frecuentemente delecionadas en nuestra serie de adenocarcinomas y las publicadas en la bibliografía, que van a ser estudiadas en profundidad.

Con el fin de definir un perfil con valor pronóstico se llevó a cabo un estudio de regresión logística penalizada (via ElasticNet) teniendo en cuenta las variables clínicas de los pacientes, las alteraciones en número de copia y la LOH descrita, separando los dos subgrupos principales, adenocarcinomas y carcinomas escamosos. Se incluyeron también, los datos de expresión obtenidos previamente de un subgrupo de nuestros pacientes. Hemos trabajado además, con un conjunto de bases de datos de arrays de expresión y número de copia de series ya publicadas de estadios iniciales: 168 muestras de estadio I y II de la base de datos del TCGA, y las bases GSE25016, GSE34140, GSE28571 y GSE28572. Las distintas bases de datos han sido utilizadas indistintamente como series de training y test para generar los perfiles asociados a recaída. Con todos estos datos hemos descrito un perfil pronóstico asociado a la recaída de estos pacientes de estadios iniciales que va a ser validado próximamente

en una serie independiente de tumores de las mismas características.

En paralelo, hemos centrado nuestro interés en una nueva región frecuentemente amplificada en carcinoma escamoso descrita en nuestra serie, la región 3q29. Hemos seleccionado un conjunto de genes presentes en esta región, por su posible potencial como dianas terapéuticas para el tratamiento de este subtipo histológico. Así, hemos realizado estudios funcionales *in vitro* para valorar el efecto de la inhibición de estos genes en la capacidad de proliferación, migración e invasión de las células tumorales.

El desarrollo de este proyecto nos ha resultado de gran utilidad para la búsqueda de genes que puedan predecir la recaída de pacientes con estadios iniciales de carcinoma de pulmón. Además, la gran cantidad de datos generados con el análisis de los arrays ha abierto nuevas líneas de trabajo que van a ser explotadas en futuros proyectos del grupo.

---

## Diseño y evaluación de una intervención de enfermería para el cuidado de la boca en pacientes oncológicos hospitalizados

### C. Oroviogicoechea

#### FUNDAMENTO

Los pacientes con cáncer presentan con frecuencia alteraciones en la mucosa oral debido a la enfermedad y efectos secundarios de los tratamientos. Identificar de manera precoz estos problemas y tratarlos adecuadamente previene complicaciones y mejora el confort y calidad de vida de los pacientes. Los objetivos del estudio fueron: 1) traducir y validar al español la escala de la valoración de la cavidad oral (OAG) diseñada por Eilers en 1988, 2) diseñar un protocolo de actuación para el cuidado de la boca e implantarlo en unidades de hospitalización oncológica y 3) evaluar los resultados de la implantación del protocolo.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio cuasi-experimental pre e post intervención. Se llevó a cabo en unidades de onco-hematología de la Clínica Universidad de Navarra con pacientes con cáncer y enfermeras que trabajaban en esas unidades. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del centro. Para el cálculo del tamaño muestral de pacientes en las distintas etapas del estudio (fase de validación de la escala, fase pre-

intervención y fase post-intervención) se aplicó el modelo de estados de Simon en varias fases con un error alfa de 0,10 y un valor beta de 0,10 y un porcentaje de pacientes perdidos de un 5%. El modelo nos da unos tamaños de 37, 44 y 41 respectivamente. Todas las enfermeras que trabajaban en las unidades fueron invitadas a participar. Las fases del estudio fueron las siguientes: 1) traducción de la escala a través del proceso de traducción y retrotraducción realizado por bilingües y medida de sus aspectos psicométricos: consistencia interna, fiabilidad interjueces entre dos enfermeras, validez concurrente y factibilidad 2) diseño del protocolo basado en la bibliografía, datos de los pacientes y un grupo de expertos, y su implantación incluyendo el protocolo en el registro informático, impartiendo sesiones formativas al personal de enfermería y realizando un seguimiento por un investigador para su implantación en la práctica clínica 3) la eficacia de la implantación del protocolo se midió a través de los conocimientos de las enfermeras sobre cuidados de la boca, satisfacción de los pacientes, capacidad de autocuidado y comparación de los problemas bucales del paciente entre el grupo control e intervención. Los instrumentos utilizados para el estudio fueron: Escala de valoración de la cavi-

dad oral (OAG), Escala de la mucositis de la OMS, cuestionarios diseñados para el estudio para conocer la opinión de los pacientes y enfermeras sobre la OAG, cuestionario para conocer la satisfacción del paciente sobre la atención recibida y grado de conocimiento sobre el cuidado de su boca. Las enfermeras además cumplimentaron un cuestionario acerca de conocimientos, habilidades y actitudes sobre el cuidado de la boca antes y después de recibir la formación.

**RESULTADOS**

Se ha obtenido la primera versión española de la OAG (Fig. 1) con una buena consistencia interna (alpha de Cronbach 0,6) y armonía interjueces (r=0,83), sin embargo la validez concurrente con la escala de mucositis de la OMS fue aceptable (r=0,458). Se encontró que la escala era factible para ser utilizada en la práctica clínica.

Se diseñó un protocolo que incluye la valoración de la boca con la OAG y los conocimientos que tiene el paciente sobre su cuidado, cuidados de prevención de problemas de la boca y medidas de actuación cuando surgen. También incluye contenidos de educación al paciente. Se impartieron sesiones formativas a todas las enfermeras y se les proporcionó el material necesario para utilizar el protocolo en la práctica clínica.

En el grupo intervención se encontró que los pacientes mejoraban en todos los aspectos de cavidad oral medidos por la OAG a lo largo del ingreso mientras que en el grupo control hay un

leve empeoramiento en lengua y saliva (Tabla 1). Por otra parte los pacientes del grupo intervención mejoran significativamente a los tres días de aplicar el protocolo en deglución, labios y saliva. Hay una mejora significativa en el grupo post-intervención en la información proporcionada por la enfermera y la capacidad de actuar ante la sequedad también mejora significativamente. Además, el 100% de las enfermeras consideraron necesario la implantación del protocolo y opinaron que proporcionaba un mejor control y tratamiento del cuidado de la boca. Consideraron que la formación que habían recibido era uno de los aspectos más positivos del protocolo.

**CONCLUSIONES**

Existe disponible en España una escala validada para valorar la cavidad oral (OAG) en pacientes con cáncer con adecuadas propiedades psicométricas. Se ha diseñado e implantado un protocolo para los cuidados de la boca que ha ayudado a las enfermeras a mejorar los cuidados de control y tratamiento de la boca en la práctica clínica. Además los pacientes perciben que han recibido más educación sobre problemas de la boca y conocen cómo actuar ante ellos. La implantación del protocolo ha mejorado los problemas de la boca en los pacientes ingresados especialmente en deglución, labios y saliva. Futuros estudios deberían aplicar este protocolo en otros ámbitos y en poblaciones más numerosas.

GUÍA DE VALORACIÓN ORAL			
Categoría	1	2	3
Voz	Normal	Profunda o ronca	Dificultad para hablar o dolor
Deglución	Normal	Algo de dolor al tragar	Incapacidad para tragar
Labios	Suaves, rosados y húmedos	Secos o agrietados	Ulcerados o sangrantes
Lengua	Rosada y húmeda con presencia de papilas	Saburral o pérdida de papilas con apariencia brillante o sin enrojecimiento	Ulcerada o sangrante
Saliva	Acuosa	Densa o viscosa	Ausente
Mucosa	Rosada y húmeda	Enrojecida o saburral (más blanquecina) sin ulceraciones	Ulceraciones con/sin sangrado
Encía	Rosada, punteada y firme	Edematosa con o sin enrojecimiento	Sangrado espontáneo o al presionar
Dientes o prótesis (o zona de apoyo)	Limpios y sin residuos	Placas o residuos en áreas localizadas (entre los dientes, si están presentes)	Placa o residuos generalizados en la línea de la encía o la zona de apoyo de la prótesis

**Figura 1.** Versión definitiva de la escala de valoración de la cavidad bucal en castellano. (Clínica Universidad de Navarra).

**Tabla 1.** Comparación de la evolución del estado de la cavidad oral entre el grupo control e intervención

Categoría	Grupo control		Grupo intervención	
	Día 1 Media (DE)	Día 3 Media (DE)	Día 1 Media (DE)	Día 3 Media (DE)
Voz	1,14 (0,41)	1,14 (0,41)	1,09 (2,85)	1,09 (2,85)
Deglución	1,24 (0,48)	1,21 (0,41)	1,02 (0,14)	1 (0,00)
Labios	1,48 (0,59)	1,45 (0,59)	1,22 (0,41)	1,11 (0,31)
Lengua	1,83 (0,73)	1,86 (0,71)	1,67 (0,47)	1,63 (0,53)
Saliva	1,21 (0,47)	1,29 (0,45)	1,07 (0,25)	1,07 (0,25)
Mucosa	1,21 (0,56)	1,24 (0,57)	1,11 (0,31)	1,09 (0,28)
Encía	1,05 (0,21)	1,05 (0,21)	1,04 (0,20)	1,04 (0,20)
Dientes y prótesis	1,21 (0,47)	1,14 (0,41)	1,30 (0,46)	1,25 (0,43)
Total de la escala	10,38 (2,5)	10,38 (2,4)	9,5 (1,1)	9,2 (1,02)

## Evaluación de la efectividad de la vacuna de la varicela: duración del efecto protector y efecto de la segunda dosis

**M. García Cenoz**

### IMPACTO DE LA VACUNACIÓN UNIVERSAL FRENTE A LA VARICELA, 2006-2011

La incidencia de la varicela disminuyó progresivamente, desde 8,04 casos por 100.000 habitantes en 2006, a 0,43 en 2011, lo que supone una reducción del 94,6% ( $p < 0,0001$ ). La incidencia de la varicela en niños de 0-14 años disminuyó de 50,1 casos por cada 1.000 habitantes en 2006 a 2,2 casos por cada 1.000 habitantes en 2011, lo que representó una reducción del 95,7%.

### EFFECTIVIDAD DE LA VACUNA DE LA VARICELA

Entre 2007 y 2011, 34.446 de los 41.081 niños nacidos entre 2004 y 2009 recibieron al menos una dosis de vacuna (83,8%). En ese mismo periodo, se diagnosticaron 2.328 casos de varicela en los niños nacidos entre 2004 y 2009, y 212 de esos casos habían sido previamente vacunados (9%). De acuerdo a ello, la efectividad de al menos una dosis de vacuna de varicela fue del 97,2% (IC 95%: 96,8-97,6%).

Se realizó un estudio de casos y controles apareado, con casos de varicela confirmados

por PCR entre 2011 y 2012. En el análisis de regresión logística condicional la efectividad de cualquier dosis de vacuna fue de 92% (IC 95%: 77% a 97%). El haber recibido una única dosis de vacuna mostró una efectividad del 87% (IC 95%: 60% a 97%), y la efectividad de dos dosis fue del 97% (IC 95%: 80% a 100%). Se encontraron resultados similares en el análisis restringido a los niños de 3 años o más. La segunda dosis de vacuna confirió una protección incremental del 74% (IC 95%: -115% a 100%,  $p = 0,231$ ) en comparación con una sola dosis, aunque este resultado no fue estadísticamente significativo.

Entre los vacunados con una única dosis, la efectividad fue del 93% (IC 95%: 34% a 100%) en los primeros 12 meses después de la vacunación, 95% (IC 95%: 62% a 100%) entre 12 y 35 meses después de la vacunación, y 61% (95% CI: -64% a 94%) después de 35 meses. El tiempo después de la vacunación medido como variable continua en años, se asoció con un mayor riesgo de fallos vacunales entre los niños que habían recibido una dosis de vacuna (OR = 2,07, 95% CI 1,13-3,80,  $p = 0,019$ ).

# Nutrigenómica y obesidad infantil: efecto de una intervención dietética sobre la expresión de genes de la inflamación y el estrés oxidativo en niños obesos (NUGENOI)

**A. Martí del Moral**

Departamento Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Universidad de Navarra

## FUNDAMENTO

El fundamento del trabajo fue evaluar el efecto de una intervención nutricional de 10 semanas, basada en una restricción calórica moderada, en niños con sobrepeso y obesidad sobre parámetros metabólicos y de estrés oxidativo, así como sobre el perfil de expresión génica en células de la sangre (PBMC).

## MATERIAL Y MÉTODOS

La intervención fue completada por 44 sujetos (50% varones), entre 7 y 15 años, con sobrepeso u obesidad y ausencia de otras patologías. La población procedía de las unidades de Endocrinología pediátrica de los departamentos de Pediatría de la Clínica Universidad de Navarra y del Complejo Hospitalario de Navarra (Pamplona).

El periodo de intervención fue de 10 semanas. El control de peso y seguimiento dietético fue semanal y se realizó por un dietista-nutricionista mediante sesiones individuales con los voluntarios y sus padres/tutores. Los sujetos del estudio se sometieron a una restricción calórica moderada dependiente de su IMC y se les prescribió una dieta hipocalórica cerrada calculada según su metabolismo basal, en función del sexo, y compatible con el crecimiento corporal. Además, los voluntarios tuvieron un seguimiento personal en educación tanto nutricional como de actividad física a lo largo de todo el periodo de intervención.

Se recogieron datos sobre la actividad física del niño y los hábitos dietéticos evaluados mediante cuestionarios validados de frecuencia de consumo y registros de 72 horas, tanto al inicio como después de la intervención nutricional. Todos los datos fueron recogidos mediante entrevista personal realizada por personal entrenado, en un ambiente sanitario relajado. Además se recogieron muestras de sangre y orina al inicio y tras la intervención.

El diseño del estudio dividió a los 44 voluntarios en dos grupos según la mediana de la pérdida de peso tras la intervención. Así, aquellos que perdieron  $\geq 0,50$  IMC-SDS fueron considerados

sujetos de "buena respuesta" (BR) y aquellos que perdieron  $< 0,50$  IMC-SDS fueron considerados sujetos de "mala respuesta" (MR) a la intervención dietética. Esta división resulta de interés, ya que se ha demostrado que la pérdida de 0,5 puntos de IMC-SDS en jóvenes con obesidad conlleva mejoras en la salud de esta población.

## RESULTADOS

El estudio consta de tres apartados. El primer capítulo se realizó en niños y niñas con obesidad, según su respuesta a la dieta y estudia la capacidad antioxidante y el estrés oxidativo tras el programa de intervención. Se observó que tras la intervención nutricional, ambos grupos redujeron el consumo de energía total. Por otra parte, este estudio mostró una asociación positiva entre la TAC dietética y la ingesta de algunos nutrientes antioxidantes durante el periodo de intervención en ambos grupos. En el grupo BR, tras la intervención, la disminución en la TAC de la dieta se asocia negativamente con la pérdida de peso ( $\beta = -0,465$ ;  $p = 0,029$ ). Además, los niveles séricos basales de TAC predicen el cambio en el F2 isoprostano urinario ( $\beta = -0,436$ ;  $p = 0,034$ ). Las ratios  $\Delta TAC$  sérica/ $\Delta TAC$  dietética y  $\Delta F2$  isoprostano/ $\Delta TAC$  dietética mostraron que la TAC dietética tiene menos influencia sobre los marcadores de estrés oxidativo (TAC sérica y 8-isoprostano-F2 $\alpha$  urinario) en el grupo BR que en el grupo MR. En conclusión, nuestro estudio sugiere que la TAC dietética puede ser un indicador de la calidad de la dieta en niños obesos que han finalizado con éxito un programa de intervención para la pérdida de peso. Además, la capacidad antioxidante del suero antes de la intervención parece predecir el estado oxidativo tras la misma, en niños/as obesos con una buena respuesta a la dieta.

El segundo capítulo analiza la asociación entre CT-1 y los niveles de colesterol tras la pérdida de peso en la misma población. Los niveles séricos de CT-1 se redujeron significativamente en el grupo BR (-7%;  $p = 0,043$ ) después de la intervención. Este grupo, además, presentaba menor peso corporal (-5,5%;  $p < 0,001$ ), masa grasa

(-8%;  $p < 0,001$ ), IMC-SDS (-19,5%;  $p < 0,001$ ) y circunferencia de cadera (-6%;  $p < 0,001$ ), y una mejora significativa en su perfil lipídico y glucídico ( $p < 0,05$ ). Además, la disminución de los niveles de CT-1 predicen significativamente el cambio en los niveles de colesterol total (41%) y LDL-colesterol (28%). En conclusión, nuestro estudio muestra por primera vez una reducción de los niveles de CT-1 sérica después de un programa de intervención nutricional para la pérdida de peso en niños/as obesos con una buena respuesta a la dieta, y que esa disminución se asocia con menores niveles de colesterol.

El tercer capítulo se realizó en niños obesos, según su respuesta a la dieta y analiza el perfil transcriptómico de éstos en células mononucleares tras la restricción calórica. El estudio mostró por primera vez la expresión en PBMC de niños obesos que han sido sometidos a un pro-

grama para la pérdida de peso. Antes de la intervención, el grupo de BR presentó menor expresión de genes relacionados con la inflamación y la respuesta inmune, sugiriendo que el grupo de niños con MR puede tener estado proinflamatorio más desarrollado. Al mismo tiempo, los genes LEPR y SIRBP1 se encontraron más expresados en el grupo MR, indicando una tendencia hacia el deterioro de la respuesta inmune y la resistencia a leptina. Además, el programa de pérdida de peso reguló de forma negativa la vía de señalización MAPK en los niños del grupo BR, así como alguno de los genes relacionados con inflamación, como AREG y TNFAIP3. En conclusión, este estudio muestra que los cambios en la expresión génica en PBMC de niños obesos pueden ayudar a entender la respuesta a la pérdida de peso. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para confirmar estos resultados.

---

## Alquil-lisofosfolípidos y cáncer: desarrollo de nanotransportadores lipídicos para administración por vía oral y estudios preclínicos

**M. J. Blanco-Prieto**

La edelfosina es un alquil-lisofosfolípido sintético que se incluye en una clase de agentes antitumorales con efectos adversos limitados, pero que presenta una baja biodisponibilidad oral. Para solventar este tipo de inconvenientes, las nanopartículas lipídicas se han propuesto como nuevos sistemas de vectorización de fármacos. En el proyecto "Alquil-lisofosfolípidos y cáncer: desarrollo de nanotransportadores lipídicos para administración por vía oral y estudios preclínicos" hemos obtenido nanopartículas lipídicas cargadas con edelfosina de un tamaño aproximado de 100 nanómetros, apropiadas para su administración por vía oral. También hemos demostrado que estas nanopartículas, principalmente absorbidas por vía linfática, aumentan la biodisponibilidad oral de la edelfosina en 150%. Además, en ensayos de evaluación de la eficacia de las nanopartículas desarrolladas tanto en líneas celulares de leucemia como en una línea celular de cáncer de mama y glioma, las nanopartículas son capaces de vencer la resistencia de la línea tumoral a la acción del fármaco en los tres tipos de líneas celulares de cáncer. Por otro lado, los nanosistemas lipídicos aumentaron de forma significativa la acumulación de fármaco en el cerebro debido a la inhibición que ejerce

uno de los componentes de la formulación, el Tween® 80, sobre la P-glicoproteína. Tras observar estos efectos, las nanopartículas lipídicas cargadas con edelfosina fueron probadas en modelos animales de linfoma de manto y glioma. Ratones a los que previamente se les había implantado un linfoma de manto o un glioma fueron tratados por vía oral con una solución de edelfosina o con nanopartículas lipídicas cargadas con el fármaco. Al final del experimento, los tumores se midieron y se compararon entre sí. Se confirmó que las nanopartículas lipídicas con edelfosina fueron más efectivas que la solución del fármaco libre en ambos modelos animales. Por otro lado, se analizaron macroscópicamente los ganglios linfáticos de los ratones con linfoma en búsqueda de metástasis. Los nanosistemas lipídicos evitaron el 100% de la metastatización, ya que no se observó ninguna metástasis en el grupo de ratones tratados con las nanopartículas, mientras que la solución de edelfosina libre no fue suficientemente eficaz en la eliminación del proceso metastático. En conclusión podemos afirmar que el uso de nanopartículas lipídicas cargadas con edelfosina podría ser una interesante alternativa terapéutica para el tratamiento de distintos tipos de cáncer.

# Eficacia de la estimulación magnética transcraneal en la rehabilitación de la marcha en la enfermedad de Parkinson: Un estudio mediante resonancia funcional (RMf)

F. Villagrà

Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA)

## FUNDAMENTO

Desde el punto de vista de la neuroimagen, la locomoción es un aspecto difícil de analizar dado que se trata de un movimiento automático, además de que las distintas técnicas –PET, RMf y EEG– requieren que los sujetos no muevan la cabeza durante la tarea de registro. Hasta la fecha, los estudios de neuroimagen que investigan sobre los principios de la locomoción lo hacen desde dos perspectivas diferentes: 1. Estudios de marcha imaginada y 2. Estudios de movimientos aislados repetitivos de ciertas extremidades que intervienen en la marcha, como flexión/extensión de rodillas y tobillos. Con esta asociación, se ha sugerido una red neural compuesta de diferentes áreas que interviene en la marcha, como SMA, córtex premotor o cerebelo o en distintos aspectos relacionados con ella, coordinación, atención. Ciertas aproximaciones a la marcha emplean dispositivos para facilitar el movimiento y registrar valores intrínsecos a la tarea. Uno de los objetivos del proyecto desarrollado y apoyado por el Gobierno de Navarra es investigar las modificaciones en la activación cerebral –medida en RMf– durante diferentes frecuencias de movimientos alternantes y repetitivos de las extremidades inferiores.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para evaluar las bases cerebrales del control de la marcha usamos movimientos repetitivos de las rodillas y tobillos alternantes simulando la marcha en la posición de decúbito supino, ayudados por una plataforma vertical móvil (PVM), que imita una cinta de marcha. Este sistema compatible con la resonancia magnética funcional ha sido desarrollado por el CEIT (Centro de Estudios e Investigaciones de Guipuzcoa). La PVM se instala dentro de la máquina de RMf. Para evaluar la base cerebral de control de marcha, se diseña un paradigma visual en el que se muestran dos pies que caminan a diferente cadencia que el sujeto ha de seguir. Los *parámetros*

*cinemáticos* obtenidos de la PVM son  $\alpha$  (ángulo de cada una de las rodillas) y  $\theta$  (distancia recorrida por cada uno de los pies). De esta forma se puede evaluar diferentes terapias y caracterizar la cinemática de la locomoción en la salud y en la enfermedad.

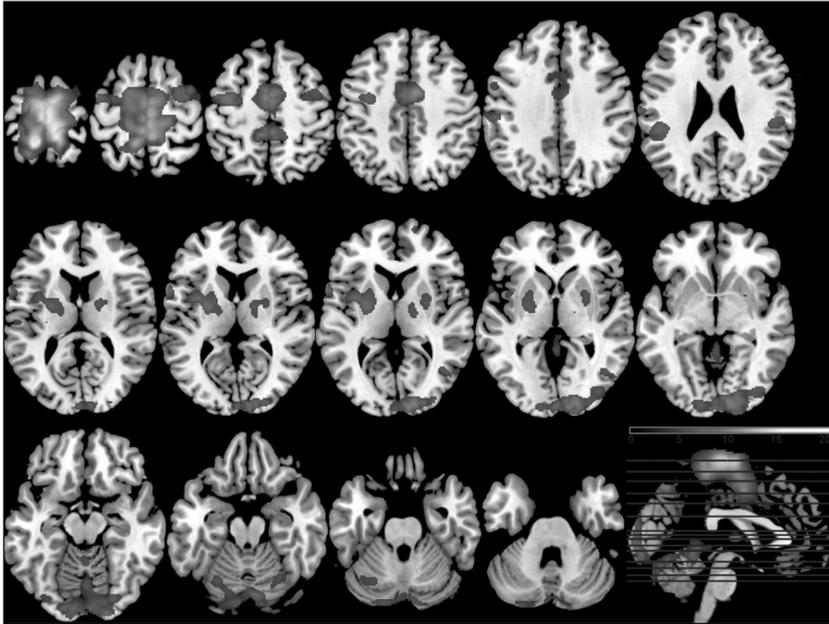
El dispositivo permite la evaluación de la base cerebral de control de la marcha y estudio de diversos parámetros intrínsecos de la marcha de interés: cadencia, distancia recorrida y ángulos en las rodillas que ayudan a evaluar la eficacia de la terapia. Feedback de la tarea que el sujeto realiza en la RMf.

## RESULTADOS

Se han llevado a cabo estudios en 20 voluntarios jóvenes sanos para validar el dispositivo con registros cinemáticos y de resonancia magnética funcional. Por otro lado se investigó dichos registros en voluntarios sanos mayores y pacientes parkinsonianos. Estos dos últimos grupos forman parte de un estudio longitudinal de rehabilitación que estamos actualmente realizando en la Universidad de Navarra. Se ha validado el dispositivo en la que se pueden medir de una forma objetiva la actividad cerebral en un individuo (Fig. 1). Se detectó actividad cerebral bilateral en áreas motoras primarias suplementarias, prefrontales somatosensoriales. Adicionalmente hubo activaciones en las ínsulas, giro supramarginal, giro temporal medio/superior, giros temporales medio, corteza visual primaria y asociativa, tálamo, putamen y corteza motora somatosensorial cerebelosa.

En conclusión, el sistema desarrollado en el presente proyecto permite registrar datos cinemáticos que corresponden objetivamente a la actividad cerebral en la resonancia magnética durante la simulación de la locomoción.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto aumentan los conocimientos de la integración somatosensorial y una mejor comprensión de la contribución de estructuras supraespinales en el control de la locomoción en la salud y en la enfermedad.



**Figura 1.** Actividad cerebral (BOLD signal) asociado a movimientos repetitivos alternantes de miembros inferiores. Cambios de la señal fueron considerados significativos al nivel de  $p > 0.05$  (FWE-voxel corrected).

Actualmente el proyecto continúa, y se está investigando la interacción entre la actividad cerebral y los parámetros cinemáticos en la evaluación longitudinal de la recuperación motora

en pacientes neurológicos. Dicha terapia neuro-rehabilitadora se basa en el uso de técnicas de estimulación cerebrales no invasivas combinadas con la actividad física (marcha).

---

## Valoración de marcadores pronósticos de respuesta a bevacizumab en pacientes con cáncer colorrectal avanzado y su utilidad para la individualización del tratamiento

**J. García-Foncillas<sup>1</sup>, E. Bandrés<sup>1</sup>, M. González-Huarriz<sup>1</sup>, I. López<sup>1</sup>, J. Rodríguez<sup>1</sup>, R. Zárate<sup>1</sup>, N. Bitarte<sup>1</sup>, N. Ramírez<sup>1</sup>**

1. Laboratorio de Farmacogenómica, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) y Departamento de Oncología, Clínica Universidad de Navarra.

### FUNDAMENTO

La incorporación de nuevos fármacos dirigidos frente a dianas moleculares específicas en el tratamiento del cáncer está suponiendo, en los últimos años, un gran avance clínico. No obstante, estos mejores resultados se traducen en un

enorme esfuerzo económico para los sistemas sanitarios. Es necesario, por lo tanto, profundizar en el conocimiento de los factores clínicos y biológicos que nos puedan ayudar en la selección de aquellos pacientes con mayor probabilidad de respuesta a estos fármacos, de cara a

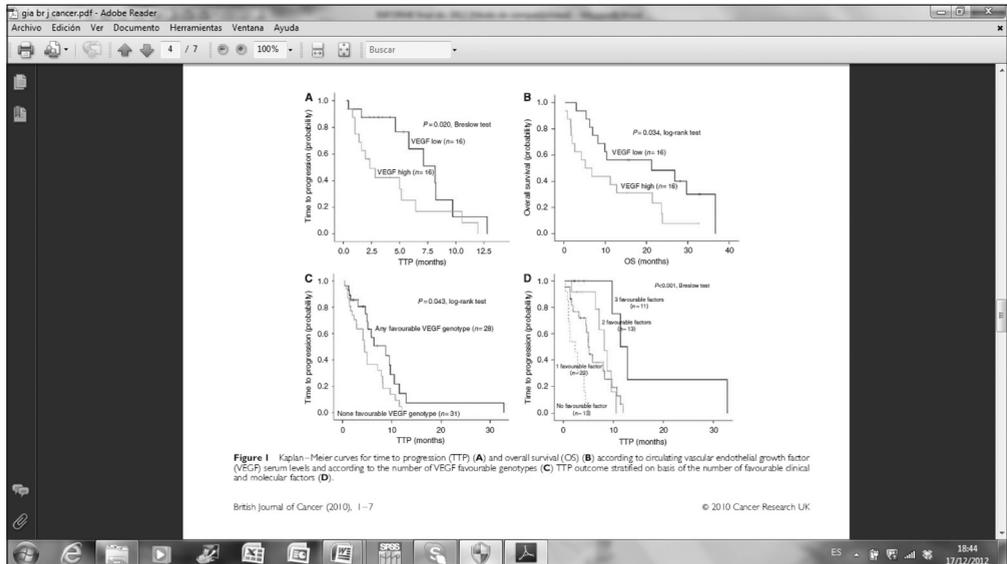
racionalizar y optimizar el empleo de estos agentes biológicos.

Se ha demostrado que el proceso de angiogénesis es uno de los factores críticos en la iniciación y desarrollo del proceso de metástasis. El factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A) es uno de los factores más importantes en inducir el proceso angiogénico en cáncer. Bevacizumab (Avastin, Roche) es un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado con una acción neutralizante frente al VEGF-A. Se ha demostrado que la adición de bevacizumab a la quimioterapia con ácido folínico, 5-Fluorouracilo e irinotecan (IFL), en pacientes con cáncer colorrectal metastático (mCCR), incrementa la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión y la tasa de respuesta. Sin embargo, hoy por hoy, no se han descrito biomarcadores que nos ayuden a predecir la respuesta obtenida al tratamiento con bevacizumab. La imposibilidad de obtener muestra de tejido tumoral, nos conduce a la búsqueda de nuevas muestras que permitan predecir y monitorizar la respuesta a los tratamientos recibidos. En este caso, la determinación de proteínas solubles en suero o de polimorfismos genéticos, puede ser de gran utilidad para valorar la actividad terapéutica de los fármacos anti-angiogénicos.

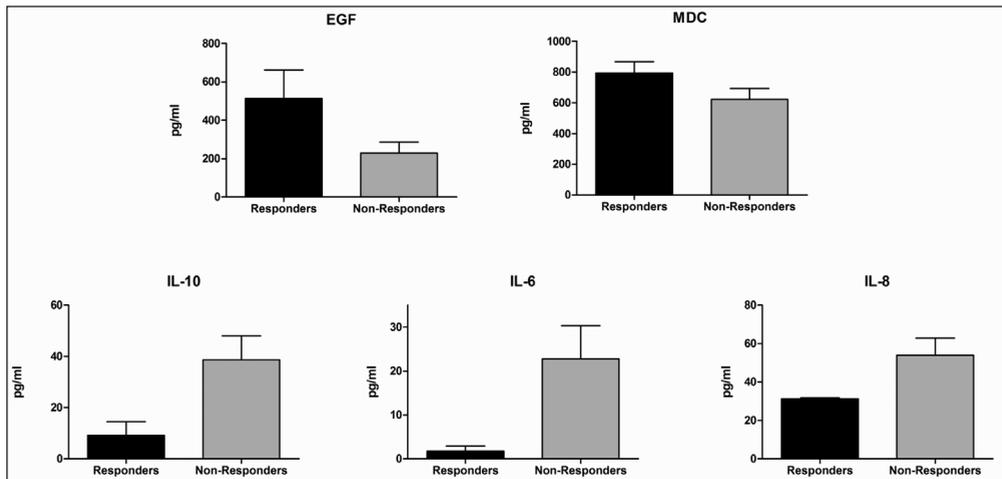
Nuestro estudio se centra en el análisis de los niveles de expresión de proteínas implicadas en el proceso de angiogénesis en el suero de pacientes con cáncer colorrectal metastático predictivos de la respuesta a bevacizumab. Por otro lado, se ha demostrado que determinados polimorfismos genéticos determinan las variaciones interindividuales existentes en toxicidad y eficacia de fármacos. En nuestro caso se evaluaron las variaciones génicas que pueden afectar la expresión o función de proteínas implicadas en el proceso de angiogénesis.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

Se incluyeron un total de 59 pacientes con mCRC tratados con un esquema de quimioterapia paliativo basado en irinotecan y bevacizumab. El estudio de polimorfismos genéticos del gen VEGF fue realizado mediante discriminación alélica y sondas taqman y los niveles de VEGF-A en suero fue cuantificado mediante EIA. La cuantificación de los niveles en suero de 24 proteínas relacionadas con el proceso angiogénico fue realizado mediante la tecnología luminex y un ensayo de cuantificación múltiple (MBA). Los resultados fueron validados mediante EIA.



**Figura 1:** Análisis de Kaplan-Meier para los TTP (A) y OS (B) de acuerdo a los niveles de VEGF en suero y de acuerdo al número de genotipos de VEGF favorables (C) o de acuerdo al número de factores clínicos o moleculares favorables (D).



**Figura 2.** Diferencias en los niveles de aquellas proteínas detectadas en suero y que discriminan pacientes respondedores versus no-respondedores al tratamiento basado en bevacizumab.

## RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

Tras una mediana de seguimiento de 42 meses, la mediana del tiempo a la progresión (TTP) y de la supervivencia global (OS) fueron 5,2 y 19,9 meses, respectivamente. Los niveles de VEGF en suero fueron significativamente superiores en aquellos pacientes de riesgo alto (de acuerdo a la clasificación de Köhne) que en los pacientes de riesgo bajo. Con el fin de relacionar los niveles de VEGF con el TTP y OS, los valores de VEGF fueron dicotomizados en relación a la mediana. Los pacientes con niveles altos de VEGF presentaron un menor TTP ( $p=0,02$ , Fig. 1A), con una mediana de 2,4 meses (0,83-3,89) que los pacientes con niveles bajos, con un TTP de 8,2 meses (5,1-11,2). También se detectó una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de VEGF y la OS ( $p=0,034$ ), con una mediana de 5,2 (0,27-10,1) y 21,3 (0,3-47,3) meses para los pacientes con altos y bajos niveles de VEGF, respectivamente (Fig. 1B). Dado que se ha descrito que determinados SNPs en el gen del VEGF puede contribuir en la variabilidad de las concentraciones de VEGF en suero, analizamos si dicha asociación se observaba en nuestra cohorte de pacientes. Los niveles de VEGF fueron significativamente menores en aquellos pacientes con los genotipos VEGF-2578AA y VEGF-460CC ( $p=0,008$ ) y se observó la misma tendencia para el genotipo VEGF+405GG. Aquellos pacientes que presenta-

ban algunos de los genotipos asociados con bajos niveles de VEGF (VEGF-2578AA, VEGF-460CC y VEGF+405) tuvieron mayores TTP que el resto de pacientes (8,8 *versus* 4,5 meses,  $p=0,043$ ; Fig. 1C). Por último, se calculó un *score* predictivo del riesgo de acuerdo al número de factores favorables clínicos (bajo-riesgo Köhne y respondedores) y moleculares (algún genotipo de VEGF favorable). Con esta clasificación se obtuvieron 4 grupos de riesgo con una mediana de TTP que variaba de 2,3 meses (0,49-4,25) a 11,4 meses (8,5-14,4) y correspondía con aquellos pacientes pertenecientes al grupo con cero o tres factores favorables, respectivamente (Fig. 1D). **British J Cancer 2010; 103: 1529-1535.**

En la segunda parte del estudio, analizamos un grupo de 24 proteínas relacionadas con el desarrollo de angiogénesis en el suero de estos pacientes, previo al tratamiento. Como se muestra en la figura 2, se observaron mayores niveles de EGF y MDC en aquellos pacientes que respondieron a la terapia. Por el contrario, los pacientes respondedores presentaban niveles menores de IL-10, IL-6 y IL-8. Se calculó un *score* de riesgo, teniendo en cuenta los niveles de estos 5 factores. La mediana de TTP y la OS fue significativamente mayor en aquellos pacientes con menos de tres factores de alto-riesgo (8,1 vs 2,8 meses para el TTP,  $p<0,05$ ; 23,8 vs 5,1 meses,  $p<0,01$ ). Para validar los resultados del ensayo múltiple, los niveles de IL-6, IL-8 y MDC se analizaron mediante EIA. Se observó una correlación estadís-

ticamente significativa entre los valores determinados por ambas tecnologías, confirmando los resultados previos. Por último analizamos mediante EIA, el efecto que el tratamiento tenía sobre los niveles de IL-8, IL-6 y MDC en el suero post-tratamiento. No se detectó ningún cambio en los niveles de IL-6. Por el contrario se observó que el tratamiento inducía un descenso en los niveles de IL-8 y un aumento en los niveles de MDC, estadísticamente significativo. **Br J Cancer 2012; 107: 287-290.**

Nuestros resultados sugieren un posible papel predictivo tanto de determinados polimorfismos en el gen VEGF-A como de sus niveles en suero. Además un conjunto de citoquinas inflamatorias y relacionadas con el proceso angiogénico podrían estar asociadas con la respuesta obtenida al tratamiento con bevacizumab. Nuestros resultados confirman previos estudios pero deben ser validados en estudios prospectivos y multicéntricos con el fin de poder ser incorporados a la práctica clínica.

---

## **Análisis de marcadores de riesgo y dianas terapéuticas de infarto cerebral cardioembólico en pacientes con fibrilación auricular mediante estudio proteómico y genómico**

**J. Hermida**

### **FUNDAMENTO**

El objetivo último de este proyecto es identificar los genes (y grupos de genes) de las células de la sangre y las proteínas del suero diferencialmente presentes en pacientes con fibrilación auricular (FA) con infarto cerebral cardioembólico en comparación con los pacientes con FA que no han desarrollado infarto cerebral y construir un clasificador que permitan predecir qué pacientes desarrollarán infarto cerebral cardioembólico.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

El estudio se plantea en dos fases. La primera es un estudio piloto en el que se incluye un grupo de pacientes con FA e historia previa de infarto cerebral cardioembólico (n =8) y un grupo de pacientes exactamente igual al anterior excepto que no presentan historia de infarto cerebral. En las muestras de estos pacientes se realizará un estudio proteómico y genómico para la búsqueda de marcadores que identifiquen a los pacientes con historia de infarto. La segunda fase del estudio es la fase de validación de los resultados obtenidos en la primera fase. Para ello se estudian, en 100 pacientes con FA e infarto cerebral cardioembólico y 100 paciente con FA sin infarto cerebral cardioembólico, los candidatos a marcadores identificados en la fase anterior (proteínas y genes).

Las muestras de suero del estudio piloto se analizan mediante DIGE y Q-TOF y las técnicas de bioquímica y biología molecular adicionales para identificar las proteínas diferenciales entre los dos grupos analizados. La validación de estos resultados se realiza mediante ELISA, western blot y nefelometría dependiendo de los marcadores seleccionados.

Las muestras de RNA de las células de la sangre de los pacientes del estudio piloto se analizarán mediante microarray de RNA y su validación mediante PCR en tiempo real.

### **RESULTADOS**

Seleccionamos 673 sondas diferencialmente expresadas ( $p < 0,05$ ) entre los pacientes y controles. Este criterio es muy poco restrictivo, por lo que se aplicó el algoritmo PAM a estas sondas para seleccionar las que clasificaban mejor los distintos grupos seleccionamos 282 sondas (que corresponden a 214 genes). Comprobamos mediante "clustering" jerárquico que estas sondas seleccionadas en dos pasos eran capaces de agrupar a los casos y controles correctamente, lo cual confirma que es una buena selección de sondas. Con las 282 sondas se diseñó un clasificador utilizando un algoritmo de aprendizaje automático basado en regresión logística. Todas las muestras se clasificaron correctamente, con una sensibilidad y especificidad del 100%. Dos de los genes con más peso en el clasificador se

validaron correctamente en la población de validación.

No fuimos capaces de identificar ninguna proteína diferencial en el suero de los pacientes que clasificara a los sujetos según casos y controles.

## CONCLUSIÓN

Hemos identificado un perfil génico de las células de la sangre de los pacientes con FA que se asocia con la historia previa de ictus cardioembólico.

## Análisis de las alteraciones epigenéticas en pacientes con leucemia aguda linfoblástica

X. Agirre<sup>1</sup>, F. Prósper<sup>1,2</sup>

1. Laboratorio de Síndromes Mieloproliferativos. Área de Oncología. Fundación para la Investigación Médica Aplicada. Pamplona
2. Departamento de Hematología y Área de Terapia Celular. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona.

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) se produce por un transformación maligna de los precursores linfoides de línea B o T y es el diagnóstico más frecuente en oncología pediátrica.

En la LAL, se han detectado diferentes alteraciones genéticas que promueven la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y la transcripción aberrante de genes en las células que dan lugar a esta enfermedad, siendo las translocaciones cromosómicas, la alteración genética más importante en el desarrollo de este tipo de neoplasia<sup>1</sup>. Las translocaciones cromosómicas más comunes asociadas a la LAL-B son la: t(12;21) que conduce a la fusión de los genes *TEL* y *AML1*; translocaciones que involucran el gen *MLL* en 11q23 con varios genes asociados, siendo *AF4* [t(4;11)(q21;q23)] el más frecuente; t(9;22)(q32;q11) que conlleva la fusión de los genes *ABL1* y *BCR*; y la t(1;19)(q23;p13) que tiene como resultado la fusión de los genes *E2A* y *PBX1*. Además, los cariotipos hiperdiploides (con más de 50 cromosomas) también son frecuentes en la LAL-B, contabilizándose en un 25% de los casos. La presencia de estas translocaciones cromosómicas sirve como biomarcador en el diagnóstico y el pronóstico y ayuda a controlar la enfermedad mínima residual en pacientes con esta enfermedad hematológica. Desafortunadamente, estas alteraciones genéticas están presentes en un bajo porcentaje de pacientes de un subtipo morfológico concreto de LAL.

Recientemente se ha descrito que además de estos cambios genéticos la alteración de los mecanismos epigenéticos es uno de los cambios fundamentales en el desarrollo del cáncer<sup>2</sup>. Los mecanismos epigenéticos hacen referencia a los cambios heredables de la expresión génica que

ocurren en una célula sin producirse cambios en su secuencia genómica. A diferencia de las alteraciones genéticas que son cambios permanentes en el genoma, las modificaciones epigenéticas son reversibles. Actualmente se conocen tres mecanismos epigenéticos importantes, que son la metilación del DNA, el código de histonas y el remodelado de los nucleosomas. Entre estas, la metilación del DNA es el mecanismo epigenético más estudiado en el genoma de los mamíferos. Esta metilación del DNA ocurre principalmente en la citosina localizada en dirección 5' de la guanina en el dinucleótido CpG y se asocia con un inapropiado silencio transcripcional de los genes cuando ocurre en la regiones promotoras de los mismos.

En los estudios realizados por nuestro grupo hemos confirmado que la metilación aberrante del DNA constituye uno de los mecanismo más importante para inactivar tanto genes clásicos como genes no codificantes, como son los miRNAs en la LAL. En estos estudios hemos confirmado que esta inapropiada metilación del DNA, tanto de genes clásicos como de genes no codificantes, constituye un marcador o factor independiente de mal pronóstico en términos tanto de supervivencia libre de evento, supervivencia libre de enfermedad como de supervivencia global para los pacientes con LAL. Además, la inapropiada metilación del DNA en la LAL da lugar a la inactivación de vías de señalización importantes como es la vía de *TP53* y la activación de vías oncogénicas en las que participan *FGFR1* o *CDK6*. Interesantemente el tratamiento con compuestos que pueden revertir las alteraciones epigenéticas o activar directa o indirectamente la ruta de *p53* o inactivar las vías oncogénicas en las que están involucrados *FGFR1* o *CDK6* repre-

sentan una nueva alternativa terapéutica para los pacientes con LAL.<sup>3-6</sup>

Con la finalidad de conocer mejor el papel que juegan estas alteraciones epigenéticas en esta neoplasia hematológica y sobre todo, el efecto anti-leucémico que pueden tener distintas drogas y más en concreto las epigenéticas en esta enfermedad, hemos puesto a punto distintos modelos en ratón, tanto de LAL humana de tipo B como de tipo T. La estrategia que hemos seguido para la obtención de estos modelos ha sido la de humanizar ratones con muestras primarias de pacientes con LAL. Utilizando estos modelos de LAL humana en ratón establecidos en nuestro laboratorio y que recapitulan perfectamente la enfermedad humana, hemos realizado un estudio sobre el efecto de un inhibidor de desacetilasas de histonas como es el LBH589 o panobinostat, tanto *in vitro* como *in vivo*. En este estudio hemos observado que la combinación de esta droga epigenética con la quimioterapia

habitual utilizada en la clínica de los pacientes con LAL, reduce significativamente el número de blastos humanos en sangre y médula ósea de ratón y aumenta significativamente la supervivencia global de los ratones con LAL humana. Estos efectos son debido a la reversión de las alteraciones epigenéticas como es la inapropiada metilación del DNA y la desacetilación de las histonas. Los resultados de nuestro estudio establecen una base racional para la utilización del LBH589 en combinación con la quimioterapia habitual para el tratamiento de los pacientes con LAL.<sup>7</sup>

En resumen, los resultados obtenidos en nuestros estudios indican que la inapropiada metilación del DNA es un marcador de mal pronóstico, participa en la patogénesis de la LAL y nos ha permitido conocer nuevas dianas terapéuticas y como consecuencia de esto diseñar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar el tratamiento de los pacientes con LAL.

