

## Transplante de glía envolvente y su efecto modulador en las lesiones del núcleo parasimpático sacro (NPS) en la rata

J. I. Pascual<sup>1</sup>, A. Insausti<sup>1</sup>, A. De la Fuente<sup>2</sup>

1. Servicio de Urología. Hospital de Navarra. Pamplona.
2. Servicio de Cirugía cardíaca. Hospital de Navarra y Laboratorio de Regeneración Neural asociada al C.S.I.C. Centro de Investigaciones Biomédicas. Departamento de Salud. Gobierno de Navarra.

### INTRODUCCIÓN

Las lesiones del cerebro y médula espinal están adquiriendo una importancia social y económica creciente en los países desarrollados. Los accidentes de todo tipo son la causa principal de la muerte de niños y adultos jóvenes, sólo superada como agente causal para todas las edades, por las enfermedades cardíacas y el cáncer. Considerando el problema como número de años de vida (y trabajo) potenciales perdidos, las lesiones superan a todos los restantes problemas, porque ocurren sobre todo a personas de edad inferior a los 45 años. En España sufren lesiones medulares, en su mayoría (81%) traumáticas, diez de cada millón de habitantes.

El trauma causa muerte de neuronas y células gliales, destrucción de vasos sanguíneos y lesión de tractos axonales. Como las neuronas muertas no son reemplazadas y los axones lesionados no regeneran espontáneamente, los trastornos funcionales son permanentes. Las aproximaciones experimentales para intentar mantener y/o recuperar funciones, se han dirigido a: 1) prevenir o disminuir la muerte neuronal secundaria, 2) regenerar los axones lesionados, 3) restituir las neuronas perdidas. En los últimos años se han realizado avances significativos en estos temas y, en algunas publicaciones se informan mejoras en la función. Sin embargo, hasta la fecha, tanto la reparación anatómica como la mejora funcional obtenidas son pequeñas y las estrategias utilizadas se enfrentan a dificultades adicionales en su aplicación a pacientes. La evaluación de las funciones sensorial y motora ha sido un tópico particularmente confuso en los modelos de lesión experimental. Frecuentemente, los modelos de lesión utilizados no guardan relación con la patología humana y no está claro si las ganancias funcionales obtenidas en animales son extrapolables a las lesiones en humanos. Diversos trabajos de nuestro grupo indican que la GE transplantada en la médula espinal, en la región de transición SNP-SNC, posibilita el crecimiento axonal regenerativo en la médula espinal y la recuperación parcial de la función del órgano denervado.

Recientemente, diversos grupos están estudiando el papel de las células de la glía envolvente obtenidas de cultivos purificados del bulbo olfatorio o de la mucosa olfatoria de la rata que contiene células envolventes para reparar lesiones en la médula espinal, con un potencial terapéutico considerable.

Nuestro objetivo en el presente trabajo ha sido probar la hipótesis de que el transplante de células de la glía envolvente inyectadas en la médula lumbosacra

de la rata lesionada tras traumatismo, sea capaz de propiciar una respuesta regenerativa en el NPS lesionado y recuperar la función vesical perdida.

### MATERIAL Y MÉTODO

Se han utilizado en el estudio 87 ratas macho de la raza Wistar (Harlam®, Barcelona), de las que 10 corresponden al grupo de contusión leve (20 g/cm), 26 al grupo de contusión grave (50 g/cm) y 51 animales corresponden al grupo de contusión grave y transplante de células de la glía envolvente (OECs), con un peso que osciló entre 210 y 530 g (media 250 g).

### Método de contusión medular

El tipo de contusión (leve o grave) dependía de la altura a la que se situaba el peso: 2,5 cm para las contusiones leves y 5 cm para las graves. El peso de la pieza cilíndrica oscilaba entre 6 y 10 g, por lo que se podía calcular la fuerza aproximada del impacto, o "momento transferido o impulso" que venía determinado por la fórmula:  $I = m (2gh)^{1/2}$ .

### Procedimiento quirúrgico

Bajo anestesia general (Pentobarbital 30 mg/kg) se realizó laminectomía L1-L3 exponiendo la médula. Tras depósito de mepivacaína al 2% en la superficie medular se realizó contusión medular con una fuerza de impacto conocida (25-50 g). En los casos en que se realizó transplante de OECs se procedió a la inyección con microjeringa Hamilton de  $3 \times 10^4$  células en 1-1,5  $\mu$ l de medio de cultivo D/F, repartiendo varias inyecciones en los segmentos expuestos a una profundidad de 800 mm con la ayuda de un micromanipulador (David Kopf, Minnesota, USA) acoplado a una microjeringa. Se procedió al cierre de la herida. Se administró dosis profiláctica de antibiótico y analgesia postoperatoria, siendo retornado el animal a su caja. La vejiga se vació dos veces al día hasta adquirir reflejo automático, permitiendo administración libre de agua y comida.

### Purificación inmunomagnética de la glía envolvente

La glía envolvente se inmunopurificó utilizando esférulas magnéticas recubiertas de IgG de cabra anti-ratón (Dynabeads M450, Dinal, Oslo, Noruega), que se hacían reaccionar con la IgG contra el receptor de baja afinidad de NGF (p75). Ocho días después del cultivo primario, las células se despegaban del cultivo por digestión con tripsina (0,1%)/EDTA (0,02%). Las células de glía

unidas a las esférulas magnéticas se separaban de las otras con la ayuda de un concentrador de partículas magnéticas (Dinal, Oslo) y se marcaban con el colorante vital fluorescente PKH26 (Sigma Chem. Co., USA).

**Estudios funcionales**

Realizamos diversos controles urodinámicos con el fin de comprobar la instauración del modelo de vejiga neurógena átona, así como poder valorar la posible recuperación funcional de la vejiga urinaria, tras un período de supervivencia apropiado (mínimo 6 semanas) se realizó estudio urodinámico con un equipo MacLab®, registrando de forma simultánea la presión intrarectal (Pabd.) y la presión intravesical (Pves.), pudiendo registrar en otra gráfica la presión del detrusor (Pdet.).

**Supervivencia**

El promedio de supervivencia fue de 3 meses y para el grupo de contusión grave e implante de células OECs fue de 6 semanas de promedio. En los animales de los grupos de contusión leve y grave se realizó un estudio urodinámico a los 3 meses de la contusión. En los animales a los que se inyectaron células OECs tras contusión grave se realizó un estudio urodinámico a las 4 semanas de la contusión grave y otro antes de finalizar la supervivencia.

La perfusión se realizó en todos los casos según técnica modificada. Terminada la perfusión se procedió a la extracción de los segmentos medulares correspondientes, cono, vejiga y cerebro.

**Examen de conectividad por microscopia óptica y de fluorescencia**

El estudio del material recogido y reaccionado para la BDA, RDA y FB se efectuó por medio de su análisis en microscopio de fluorescencia y campo claro. El estudio del transporte transganglionar se realizó por medio del campo claro. Los cortes teñidos con Richardson servían para revelar la extensión de la sustancia gris medular, empleando métodos de división citoarquitectónica.

**Análisis estadístico**

Los datos están expresados como media ± error estándar (media ± E.S.). Se utilizaron los test de t-Student o el U-test de Mann-Whitney para comparación de grupos, considerando estadísticamente significativa una p<0,05.

**RESULTADOS**

El grupo de contusión medular leve presentó una recuperación funcional y motora completa a partir de las dos semanas de producirse la lesión. En los grupos de contusión medular grave sin/con trasplante de OECs, la mortalidad fue alta (46,2% y 78,4% respectivamente) a pesar de las medidas rehabilitadoras y de pauta antibiótica y analgésica instaurada. En estos casos se produjo una vejiga neurógena átona como resultado del nivel de la lesión medular y que no recuperó en el tiempo de forma espontánea ni con el trasplante de OECs.

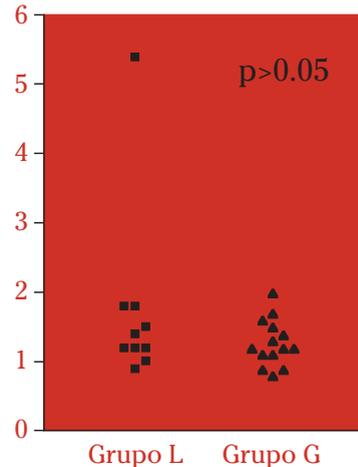
**Análisis neuromorfológico en las contusiones graves**

En los casos de contusión medular grave, se observaban extensas lesiones que se ampliaban hasta 2 nive-

les rostrales y caudalmente a la zona de contusión, múltiples quistes de inclusión, presencia de células inflamatorias y en fases posteriores aparición de fibrosis y cicatriz glial que producían un adelgazamiento intenso del espesor de la médula lumbosacra contundida.

**Comparación funcional entre contusión leve y grave**

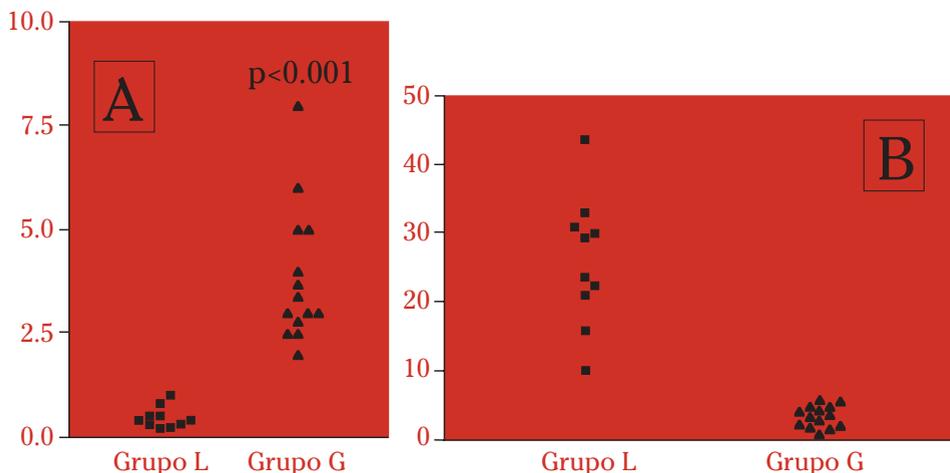
Desde el punto de vista funcional, en el animal crónico (3 meses de supervivencia) se observaron diferencias entre el grupo de contusión leve y grave. No se encontraron diferencias significativas en el peso de la vejiga urinaria en el grupo de contusión leve comparado con el de contusión grave (Fig. 1). Cuando se realizó un análisis comparativo del volumen y de la presión vesical entre los casos con contusión leve y grave, se observó una diferencia significativa entre ambos grupos, ya que en los casos de contusión grave no se produjo una recuperación funcional de la vejiga al término del período de supervivencia, al contrario que en los casos de contusión leve, donde tras un período de 2-3 semanas se producía una recuperación de la actividad vesical (Fig. 2).



**Figura 1.** Comparación entre los pesos en los casos que alcanzaron la supervivencia completa tras contusión leve (Grupo L) y grave (Grupo G). No existe diferencia significativa entre ambos grupos.

**Estudio inmunohistoquímico tras contusión grave y trasplante de células OECs**

En los animales con un día de trasplante, se pudo detectar células de la glía envolvente marcadas con PKH26 en la zona donde fueron transplantadas (Fig. 3a). En animales con 11 días post-trasplante, se observó en el sitio del implante un pequeño quiste de 200 µm de diámetro, y alrededor de éste una zona refringente y lúcida caracterizada por la presencia de tejido necrótico. El área de extensión de las células transplantadas en esta etapa fue de 2,5 mm rostrales y 2,5 mm caudales al sitio de implante (Figs. 3b y 3c). En los animales con contusión y transplantados que llegaron a completar la supervivencia (n=11) a las 6 semanas post-trans-



**Figura 2.** En (A) se observa la diferencia significativa en el volumen determinado en animales con contusión leve (Grupo L) y grave (Grupo G). En (B) diferencia significativa en la pves. en ambos grupos, lo que traduce la presencia de una vejiga neurogénica átona que no llega a recuperarse al término de la supervivencia.

plante, se observó en el área dañada una señal fluorescente muy intensa dentro del quiste, en los espacios muertos. Muchas de estas células OECs marcadas con PKH26 no presentaban la morfología típica de glía envolvente, sino que eran lúcidas y redondas y permanecían en el sitio de la lesión (Fig. 3d). Sin embargo, otras fueron encontradas en el lado contralateral en la sustancia blanca, en el tejido meníngeo, en el canal endoneurial y en sitios más ventrales cercanos a las motoneuronas de las astas ventrales. Una observación muy repetida fue ver células OECs marcadas alineadas a ambos lados de alguna estructura que recordaba a un vaso sanguíneo (Fig. 3e).

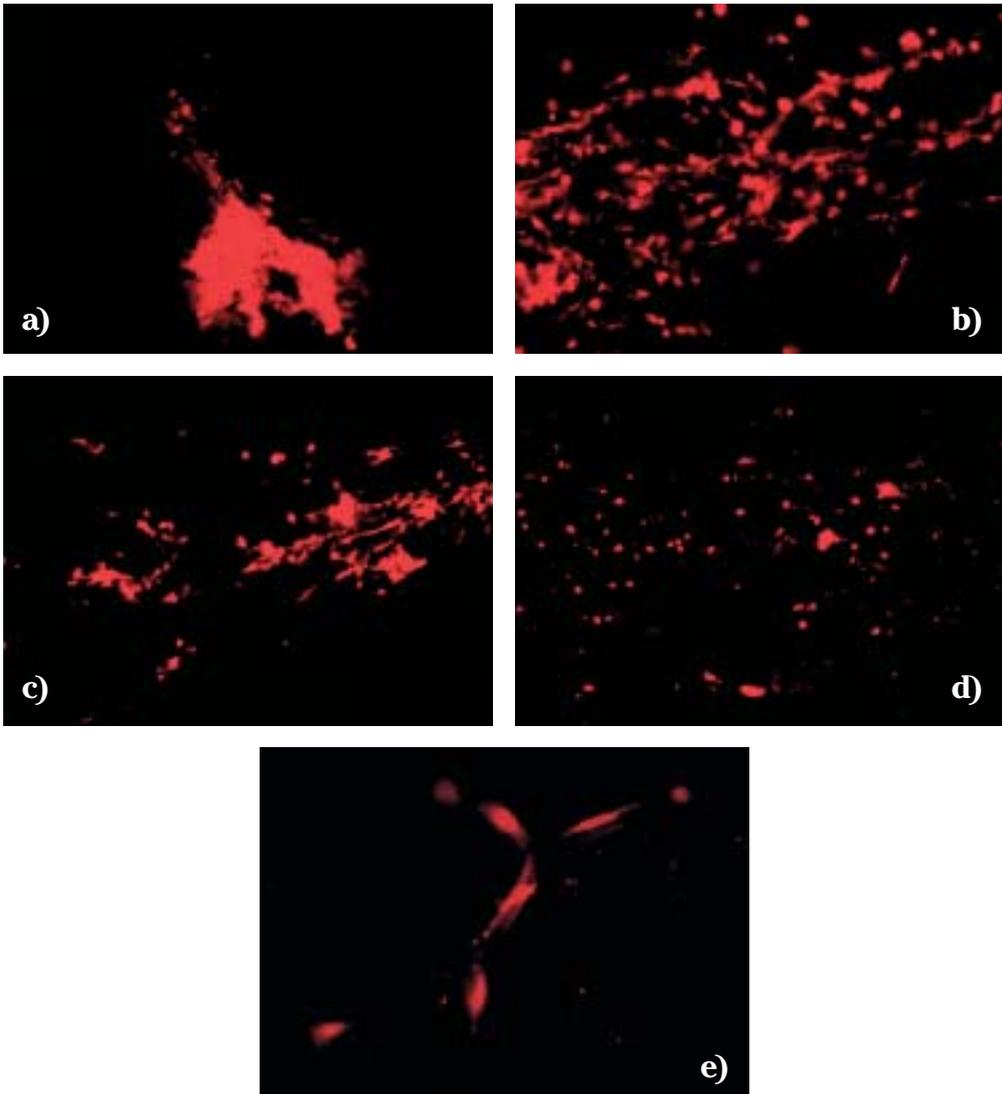
## DISCUSIÓN

En los modelos de lesión medular el éxito de la reparación con trasplantes se juzga por la supervivencia y diferenciación del trasplante y su integración sináptica con el tejido del huésped. En estas lesiones se destruyen consistentemente todos los elementos tisulares (astrocitos, oligodendrocitos, microglía y microvasos) de un área altamente circunscrita. La glía envolvente de bulbo olfatorio tiene propiedades y características similares a las células de Schwann así como capacidad de migración, capacidad de producir factores de crecimiento y moléculas de adhesión, de envolver axones y demielinizar axones. Bajo las condiciones de este estudio, en lesiones medulares incompletas, como la lesión grave, los trasplantes de glía envolvente de bulbo olfatorio se hicieron después de ocasionar la lesión y a por lo menos 2 mm de distancia de la zona de impacto del tétón. El trasplante se realizó con microjeringa Hamilton y no con micropipeta, ya que ésta podía producir rotura de los somas de las células OECs al ser impulsadas con el Picospritzer. Después de 6 semanas de promedio las ratas se sacrificaron y el análisis inmunohistoquímico reveló que gran parte del marcaje de la glía había desaparecido o era

muy tenue, el marcaje con PKH26 se observó dentro de la lesión y dentro de los macrófagos que presentaban autofluorescencia. En algunos casos alrededor del sitio de trasplante se formó un microquiste. Las células transplantadas formaban un grumo que fue inmunoreactivo a nestina y un poco reactivo a GFAP y algunos axones no inmunomarcados se acercaban linealmente a éste. Este tipo de grumos han sido detectados cuando se transplantan tancitos o astrocitos marcados con fast blue (FB). Los tancitos mostraron inmunoreactividad a vimentina y se encontraron invadidos por fibras axonales, pero no migraron.

En trabajos realizados con trasplantes de otros tipos celulares similares a la glía envolvente, como los tancitos, se ha informado que éstos fueron incapaces de sobrevivir en sitios de lesión, el estrés oxidativo es dañino para las células transplantadas. El trasplante el mismo día de la lesión es crítico, pues coincide con el tiempo de mayor secreción de radicales libres de oxígeno. Cuando la glía envolvente era transplantada 4 semanas posteriores a una lesión por transección, después de 10 semanas se presentó una mejoría en los parámetros conductuales en la escala de BBB, de 1 punto en animales control a 4 puntos en los animales transplantados. Esto indica que existen tiempos críticos para la aplicación de los trasplantes celulares y que se debe pasar la ventana de inflamación aguda para garantizar la supervivencia de las células transplantadas en lesiones agudas y severas. También el tipo de lesión influye en el grado de recuperación. En modelos de lesión por contusión se han transplantado células de Schwann y no encontró regeneración del tracto corticoespinal.

En modelos de transección completa transplantada con glía envolvente se ha observado regeneración y mejoría en el movimiento de los animales. También se ha probado en modelos de rizotomía, induciendo la reentrada de las fibras de la raíz dorsal a la médula



**Figura 3.** En a) centro de la zona de implante de OECs marcadas con PKH26 en médula espinal de rata adulta sin contusión. Día 1. En b) y c) OECs marcadas con PKH26 en médula espinal de rata adulta sin lesión. Día 11. En d) interior de lesión en médula espinal lesionada por contusión grave y fragmentos de OECs marcadas con PKH26. Día 45, en e) vaso sanguíneo en zona adyacente a la lesión, con OECs marcadas con PKH26 adheridas. Día 45.

espinal; en modelos de rizotomía lumbar (L3-L6) promueve la regeneración y la reconexión funcional de fibras aferentes; en trabajos con rizotomía lumbosacra la glía envolvente transplantada cerca del núcleo lumbosacro, las aferentes primarias de la vejiga recuperan su función a las seis semanas. De acuerdo con lo encontrado en este estudio, el modelo de lesión grave por contusión sobrepasa la capacidad de la glía envolvente para inducir regeneración, debido a la presencia de radicales libres en el sitio de lesión. La

glía envolvente se asocia a vasos sanguíneos induciendo la producción de laminina; puede formar grupos celulares no migratorios y permitir el crecimiento axonal en lesiones localizadas de tamaño pequeño. Quedaría todavía por caracterizar, desde el punto de vista fisiológico, el comportamiento de estas células transplantadas en el medio en que deben desarrollar su función regeneradora, para delimitar las que mejor cumplan el papel de restauradores del sistema nervioso central.

## Estimación de los costes asociados a la enfermedad cerebrovascular en la población de una zona básica de salud

T. Forcén

Centro de Salud de Tafalla. Navarra.

### COSTE DEL ICTUS. ENFOQUE DE INCIDENCIA RETROSPECTIVA CON SEGUIMIENTO A TRES AÑOS

**Introducción.** El coste del ictus es importante desde el punto de vista social, siendo una enfermedad con gran impacto individual, familiar y social. Los estudios de coste de la enfermedad aportan una descripción total de los aspectos económicos del ictus. La perspectiva más amplia es la social, donde se incluyen todos los costes y consecuencias. La aproximación deseable es la denominada "bottom-up".

El objeto ha sido calcular el coste del ictus desde la perspectiva social en la población de una zona básica de salud (12.000 habitantes), utilizando un enfoque de incidencia retrospectiva (seguimiento a 3 años) y una aproximación "de abajo arriba". Calcular la fracción atribuible a atención primaria, atención hospitalaria y atención social.

**Pacientes y métodos.** Todos los ictus diagnosticados entre el 1/01/1999 hasta 31/12/2003, pertenecientes a una zona básica de salud de Navarra (n=91). Recogida de datos: cuestionario "ad hoc" (Cuestionario CACV), que valora el coste "incremental" provocado por el ictus y sus complicaciones.

**Resultados.** El coste medio se sitúa en 6.331,4 euros (€) para el primer año, de 4.228,4 € para el segundo y de 4.892,3 € para el tercero. El coste en el primer año viene determinado por la atención hospitalaria, que supone el 50% de los costes. A partir del segundo año los costes de atención ambulatoria adquieren gran importancia suponiendo un 70% del total del coste.

**Conclusiones.** El coste del ictus en los tres primeros años se aproxima a los 5.000 €/año. Se necesitan más estudios para valorar los costes de la enfermedad cerebrovascular desde la perspectiva social, que debería incluir por tanto, el coste del cuidado informal.

### COSTE DEL ICTUS. ENFOQUE DE PREVALENCIA

**Introducción.** El coste del ictus es importante desde el punto de vista social, siendo una enfermedad con gran impacto individual, familiar y social. Los estudios de coste de la enfermedad aportan una descripción total de los aspectos económicos del ictus. La perspectiva más amplia es la social, donde se incluyen todos los costes y consecuencias. La aproximación deseable es la denominada "bottom-up".

**Objetivos.** Calcular el coste del ictus desde la perspectiva social en la población de una zona básica de salud (12.000 habitantes), utilizando un enfoque de prevalencia y una aproximación "bottom-up", incluyendo los costes del cuidado informal. Ofrecer datos según el grado de dependencia de los pacientes: actividades básicas (ABVD) o las actividades instrumentales de la vida (AIVD).

**Pacientes y método.** Todos los casos supervivientes diagnosticados de ictus a fecha de 31-12-2004 (n=95) pertenecientes a la zona básica de salud de Navarra. Recogida de datos: cuestionario "ad hoc" (Cuestionario CACV), que valora el coste "incremental" provocado por el ictus y sus complicaciones.

**Resultados.** Los costes medios desde la perspectiva social (incluyendo los costes informales) de la enfermedad cerebrovascular son de 18.000 euros (€) anuales. La media del coste en la enfermedad cerebrovascular en los pacientes dependientes para las ABVD es de 32.200 €/año (80% costes informales), para los pacientes dependientes AIVD es de 14.000 €/año (75% costes informales) y para los pacientes independientes de 2.500 €/año.

**Conclusiones.** La dependencia provoca que aumenten los costes globales, sobre todo por la necesidad de cuidado informal y su consecuente coste, por lo que tiene gran importancia a la hora de calcular el coste de esta enfermedad.

## Potencialidad terapéutica de los antagonistas serotoninérgicos 5-HT<sub>6</sub> en la enfermedad de Alzheimer

M. J. Ramírez

Departamento de Farmacología. Universidad de Navarra.

### FUNDAMENTO

De entre los receptores serotoninérgicos más recientemente descubiertos, el estudio de receptor serotoninérgico 5-HT<sub>6</sub> es de especial interés ya que estudios preliminares parecen mostrar su implicación en el control de funciones cognitivas y además, antipsicóticos como la clozapina muestran una buena afinidad por este receptor, lo que parece sugerir su participación en el control de la emoción y su posible utilidad en procesos como la esquizofrenia o ansiedad. Por todo ello, el receptor 5-HT<sub>6</sub> parece un firme candidato que puede participar en los procesos etiopatogénicos que subyacen en la enfermedad de Alzheimer (EA). Así, alteraciones en la expresión o funcionalidad del receptor podrían ser responsables tanto de los problemas cognitivos de la enfermedad, como de los trastornos no cognitivos (delirios, alucinaciones, agresividad) que acompañan a la misma. De ser cierta esta hipótesis, el uso de antagonistas de los receptores 5-HT<sub>6</sub> puede suponer una nueva estrategia farmacológica para el tratamiento de la enfermedad.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Los estudios con tejido cerebral humano se han llevado a cabo en muestras correspondientes a la corteza frontal y cortical (BA10 y BA20) de 42 pacientes procedentes del estudio OPTIMA. Los pacientes fueron sometidos al CAMDEX, MMSE y PBE, entrevista diseñada especialmente para este estudio con la que se obtuvieron un índice de depresión, ansiedad, psicosis y agresividad. El diagnóstico de enfermedad de Alzheimer se confirmó post-mortem mediante el CERAD.

Se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: la densidad del receptor 5-HT<sub>6</sub> por técnicas de fijación de radioligandos usando el compuesto [<sup>125</sup>I]-SB258585 como marcador, los niveles de serotonina (5-HT), glutamato, GABA y dopamina se midieron por HPLC acoplado a un sistema de detección electroquímico, los niveles de AMPc se midieron por medio de un kit comercial.

En animal de experimentación (ratas) se estudió la capacidad de liberar acetilcolina, glutamato y dopamina "in vitro" por parte de antagonistas 5-HT<sub>6</sub>. La posible localización de los receptores 5-HT<sub>6</sub> en neuronas colinérgicas se estudió por estudios de autoradiografía en animales a los que se les produjo una lesión selectiva colinérgica, por administración de la inmunotoxina 192-IgG-saporina. El efecto de antagonistas 5-HT<sub>6</sub> en el aprendizaje y memoria se estudió en la prueba del laberinto acuático de Morris.

### RESULTADOS

En los pacientes EA, encontramos descensos significativos en la densidad del receptor 5-HT<sub>6</sub> en la corteza frontal y temporal (Fig. 1). También se encontraron

reducciones significativas en la actividad del enzima colinérgico ChAT (60%), y descensos en los niveles tisulares de GABA (21%) y dopamina (58%).

La densidad del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>6</sub> en el BA20 mostró una correlación negativa, estadísticamente significativa, con el factor de hiperactividad observado en la EA (n=18; adjusted r<sup>2</sup>=0,401; p<0,05). Además, la densidad del receptor 5-HT<sub>6</sub> se correlacionó con las concentraciones de 5-HT (n=22, r=0,534\*, p=0,010), y esta correlación se pierde en mujeres. Estudios de regresión múltiple indicaron que en la EA, el factor psicosis era el mejor predictor de los niveles de 5-HT disminuidos (n=20; adjusted r<sup>2</sup>=0,267; p=0,028). Un estudio más detallado reveló que este resultado se debe fundamentalmente a las mujeres (n=11; adjusted r<sup>2</sup>=0,450; p=0,024). En la EA hemos encontrado, un descenso significativo en el cociente AMPc/5-HT<sub>6</sub> en las mujeres en comparación con los hombres (0,051±0,004 vs 0,078±0,010).

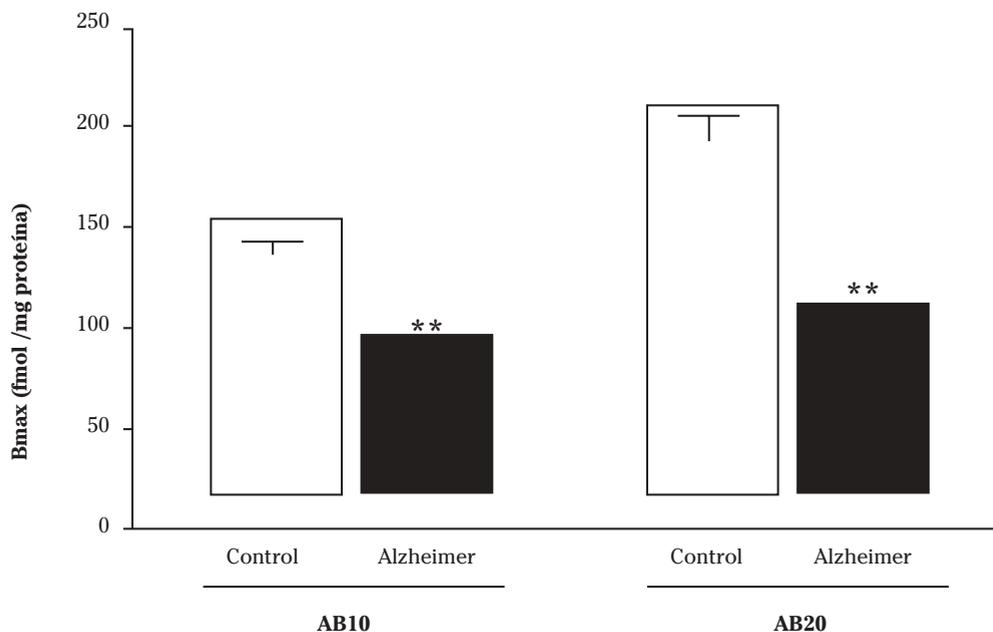
La posible localización del receptor 5-HT<sub>6</sub> en neuronas colinérgicas se estudió en la corteza frontal de ratas a las que se les había producido una lesión selectiva colinérgica, de modo que si las terminales colinérgicas desaparecen, y los receptores están localizados en ellas, la densidad de estos receptores debe disminuir también. La densidad del receptor 5-HT<sub>6</sub> no se ve afectada por la lesión.

A pesar de esta falta de localización del receptor 5-HT<sub>6</sub> en neuronas colinérgicas, antagonistas de este receptor (SB357134 y SB271046) fueron capaces de provocar una liberación de acetilcolina "in vitro", tanto en corteza frontal como en estriado. SB357134 produjo además un aumento significativo de la liberación de glutamato en la corteza frontal y estriado de rata. Además, el bloqueante selectivo de los canales NMDA, MK801, administrado conjuntamente con SB357134 mostró un efecto sinérgico sobre la liberación de acetilcolina en la corteza frontal.

Por último se estudiaron tres antagonistas distintos, SB357134, SB271046 y SB399885, en el laberinto acuático de Morris, para comprobar el efecto de su administración sobre los procesos cognitivos. Como fármaco de referencia se utilizó el inhibidor de la acetilcolinesterasa, galantamina. De los 4 fármacos estudiados, en la fase de retención de la prueba, sólo SB271046 tuvo un efecto pro-cognitivo

### CONCLUSIONES

En el presente trabajo la densidad del receptor 5-HT<sub>6</sub> se encontró disminuida en la corteza frontal y temporal, estando estas reducciones relacionadas con el factor de hiperactividad y el índice psicótico (fundamentalmente en mujeres). La implicación del receptor 5-HT<sub>6</sub> en los trastornos psicóticos todavía no ha sido



**Figura 1.** Densidad del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>6</sub> en la corteza frontal (área 10 de Brodmann) y temporal (área 20 de Brodmann) de pacientes Control y con enfermedad de Alzheimer. (Control n=20, Alzheimer n=22). \*\* p<0,01 vs. grupo Control. T de Student para muestras independientes.

esclarecida, pero dado que antipsicóticos como la clozapina, presentan una buena afinidad por este receptor, se ha sugerido que los antagonistas de dicho receptor serotoninérgico podrían tener cierta utilidad terapéutica. De todas maneras habría que considerar el hecho de que la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer presenta ciertas peculiaridades que pueden determinar que las alteraciones psicóticas no respondan al mismo patrón que la patología psicótica sin asociación a la enfermedad de Alzheimer.

Ha sido sugerido que el receptor 5-HT<sub>6</sub> pudiera tener un efecto facilitador de los procesos de aprendizaje y memoria, posiblemente a través de una modulación de la neurotransmisión colinérgica. De hecho, como ha sido mostrado en este trabajo, antagonistas 5-HT<sub>6</sub> son capaces de provocar una liberación de acetilcolina. Sin embargo, la falta de localización del recep-

tor en terminales colinérgicas, junto con su modulación de la actividad glutamatérgica, sugiere la participación de este sistema de neurotransmisión en las acciones del receptor 5-HT<sub>6</sub> sobre el sistema colinérgico. En las pruebas de cognitivas, comparando los tres antagonistas 5-HT<sub>6</sub> probados y la galantamina, el único fármaco activo fue el SB271046. Dado que numerosas compañías farmacéuticas están intentando desarrollar antagonistas 5-HT<sub>6</sub> para su uso clínico, fundamentalmente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o déficits cognitivos asociados a la esquizofrenia, y que estos pacientes estarán tomando medicaciones como inhibidores de acetilcolinesterasa o memantina (antagonista NMDA), nuestros resultados subrayan la importancia de estudios pre-clínicos usando tratamientos combinados de antagonistas 5-HT<sub>6</sub> con estos fármacos para poder estudiar potenciales interacciones entre ellos.

## Integridad de la vía de supresión tumoral TP53 y de los mecanismos de reparación del daño al DNA en neoplasias hematológicas linfoides

F. J. Novo

Departamento de Genética. Universidad de Navarra.

### FUNDAMENTO

Diversos datos sugieren que la reparación de roturas bicatenarias de ADN (*Double-Strand Breaks*, DSB) es crucial para mantener la estabilidad genómica y que, por tanto, dicha reparación podría estar comprometida en procesos tumorales en los que la inestabilidad cromosómica contribuye a la iniciación o progresión tumoral.

De los dos mecanismos principales que se utilizan en mamíferos para la reparación de DSB, se acepta que el principal mecanismo operativo en células somáticas es la fusión de extremos no homólogos (*Non Homologous End Joining*, NHEJ). Dicha vía está formada por los productos proteicos de al menos cinco genes (XRCC5/KU80, G22P1/KU70, DNA-PKcs/PRDC, XRCC4 y LIG4). Se han descrito mutaciones en algunos de estos genes que provocan la aparición de fuerte inestabilidad cromosómica y cáncer, especialmente neoplasias linfoides, y dichos hallazgos son reproducidos en modelos de ratón en los que se ha inactivado alguno de estos genes.

Dada la importancia de estos mecanismos en la iniciación del proceso tumoral, hemos investigado la integridad de la vía de reparación de DSB mediante NEHJ, y también hemos llevado a cabo un estudio bioinformático exhaustivo de los puntos de rotura implicados en las translocaciones cromosómicas recíprocas que aparecen en neoplasias humanas.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha analizado la región codificante de los genes XRCC5, XRCC4, G22P1 y LIG4 en muestras procedentes de pacientes y de líneas celulares con neoplasias linfoides. El análisis mutacional se realizó por la técnica de TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) y por secuenciación directa de fragmentos de PCR.

Para los estudios bioinformáticos se extrajeron de la literatura todos los genes implicados en translocaciones recíprocas en cáncer y se analizaron diversos

rasgos y motivos de secuencia de estos genes, con el fin de identificar elementos comunes que puedan actuar como facilitadores de la aparición de roturas en el ADN (DSB).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hemos descrito numerosas variantes genómicas en los genes estudiados. Analizando las frecuencias alélicas en las muestras patológicas y comparándolas con individuos normales, no hemos podido detectar asociación significativa de ninguna de las variantes con el desarrollo de neoplasias linfoides. Hemos descrito nuevos SNP en los genes estudiados, y hemos depositado éstas variantes en dbSNP. Además, hemos identificado una nueva mutación en el gen LIG4 en una línea celular de linfoma que muestra elevada inestabilidad cromosómica y formación de un complicón (amplificación de una translocación IgH/MYC). Dicha mutación no ha sido detectada en más de 100 individuos normales, y su significación funcional está siendo objeto de estudio.

El análisis bioinformático de los genes implicados en translocaciones recíprocas muestra importantes diferencias estructurales respecto al promedio del genoma (ver Tabla adjunta). En concreto, hemos demostrado que los genes que participan en translocaciones oncogénicas son significativamente más grandes, debido a la presencia de intrones largos. Hemos generado una base de datos de todos los intrones que contienen los puntos de rotura de estas translocaciones, y el análisis de estos intrones muestra que ninguno de los motivos de secuencia estudiados está significativamente sobre-representado respecto a intrones control. Estos datos sugieren que los puntos de rotura de estas translocaciones son el resultado de la generación aleatoria de DSB a lo largo del genoma, seguida por la reparación (probablemente mediante NHEJ) y la selección de las fusiones que aportan a la célula una ventaja proliferativa.

**Tabla 1.** Variables genómicas analizadas en genes que participan en translocaciones recíprocas en cáncer, comparados con genes control.

	Mediana (rango intercuartílico)		
	Genes control n=9.406	Genes cáncer n=268	Mann-Whitney
GC% <sup>a</sup>	45,2 (12,6)	43,3 (11,1)	n.s.
ALU%	11,1 (15,4)	10,6 (15,0)	n.s.
MIR%	2,2 (2,9)	2,1 (2,4)	n.s.
LINE%	7,9 (12,1)	7,9 (11,0)	n.s.
DNA%	1,8 (3,4)	2,0 (2,8)	n.s.
LTR%	1,4 (4,1)	1,2 (3,1)	n.s.
REPEAT%	39,2 (24,9)	36,5 (23,9)	n.s.
GENESIZE (bp)	25.805 (55.017)	59.934 (100.202)	9,8 x 10 <sup>-17</sup>
NUMTRANS	1,0 (1,0)	2,0 (2,0)	1,0 x 10 <sup>-10</sup>
INTSPERTRANS	8,0 (9,0)	9,6 (10,7)	9,6 x 10 <sup>-5</sup>
INTAVGSIZE (bp)	2.837 (4.645)	4.021 (7.075)	5,4 x 10 <sup>-9</sup>
MAXINTSIZE (bp)	9.254 (20.675)	22.521 (48.262)	1,3 x 10 <sup>-16</sup>

<sup>a</sup> GC%: contenido en G+C. ALU%, MIR%, LINE%, DNA%, LTR%: porcentaje de secuencia comprendida por cada uno de estos tipos de repeticiones. NUMTRANS: número medio de transcritos alternativos por gen. INTSPERTRANS: número medio de intrones por transcrito. INTAVGSIZE: tamaño medio de los intrones. MAXINTSIZE: tamaño del intrón mayor. Para cada variable, se muestra el valor de significación del test de Mann-Whitney, considerando significativos sólo valores p menores a 5x10<sup>-4</sup> para corregir por testeo múltiple.

## Estudio comparativo de diferentes estrategias de vacunación anti-idiotipo en modelos murinos de linfoma y mieloma

**M. Bendandi**

Laboratorio de Inmunoterapia. Oncología. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA).

### FUNDAMENTO

El linfoma folicular (LF) es una neoplasia hematológica de linfocitos B actualmente incurable. Se caracteriza por crecimiento lento, curso indolente y por responder muy bien a los tratamientos de radioterapia y de quimioterapia. Sin embargo, las recaídas son muy frecuentes y cada vez es más difícil conseguir respuestas completas. Por ello, es necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos entre los que se encuentra la inmunoterapia. El LF es un tumor muy apropiado para este tipo de tratamiento porque tiene un antígeno específico de tumor (AET). El AET es una inmunoglobulina (Ig) monoclonal presente en la membrana de todas las células tumorales. Esta Ig presenta en las regiones variables de la cadena pesada y ligera un conjunto de determinantes antigénicos (idiotopos), denominados globalmente idiotipo (Id), que son dianas para el sistema inmunitario.

El mieloma múltiple (MM) también es una neoplasia hematológica caracterizada por la proliferación clo-

nal de linfocitos B en el último estadio de maduración (células plasmáticas) que producen una Ig monoclonal tumor-específica. Clínicamente es una enfermedad caracterizada por la progresión a pesar de regímenes de quimioterápicos agresivos.

Se han realizado varios ensayos clínicos con vacunas idiotípicas en LF humano que han demostrado que la vacuna idiotípica induce una respuesta humoral y celular así como remisiones moleculares mantenidas. Nuestro grupo inició hace cuatro años un protocolo asistencial de vacunación idiotípica en pacientes con LF en primera recaída. Los resultados, que se van a publicar próximamente nos permiten afirmar que dicha metodología supone un tratamiento eficaz para el LF y nos han alentado a iniciar en el laboratorio nuevos proyectos. Sin embargo, queda por demostrar que este tratamiento cure la enfermedad y por ello, resulta interesante investigar en modelos murinos de linfoma (A20) nuevos tratamientos que potencien el efecto de la vacuna idiotípica.

Por otra parte, en MM varios trabajos muestran que la vacunación de pacientes con el Id induce una respuesta Id específica que no es tan efectiva como la demostrada para el LF. Por lo tanto, en esta enfermedad es necesario abordar nuevas estrategias capaces de controlar la enfermedad. En este sentido, nuestro grupo está llevando a cabo un ensayo clínico basado en la vacunación idiótipica del donante seguida de minialotrasplante de progenitores hematopoyéticos y vacunación idiótipica del paciente. A la espera del resultado de este ensayo resulta crucial explorar alternativas terapéuticas en modelos murinos (HOPC-1F) que puedan potenciar o mejorar la eficacia de la vacuna.

Las estrategias que se abordan en este proyecto incluyen vacunación idiótipica "clásica", células dendríticas (CD), anticuerpos monoclonales inmunoterápicos así como empleo de drogas citotóxicas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Como modelo de linfoma se utilizó la línea celular A20 y como modelo de mieloma la línea celular HOPC-1F. Ambas líneas celulares son singénicas de ratones Balb/c.

Los Id específicos de cada tumor se purificaron mediante cromatografía de afinidad a partir del sobrenadante de los cultivos y se conjugaron con KLH en presencia de glutaraldehído.

Las células dendríticas se obtuvieron tras cultivo "in vitro" de precursores celulares obtenidos de la médula ósea de ratones Balb/c. Cuando así se precisó se indujo maduración de las DC mediante incubación con TNF- $\alpha$  recombinante.

Los animales se inmunizaron por vía subcutánea con 25  $\mu$ g de Id solo o junto con (conjugado, Id-KLH o sin conjugado, Id+KLH) 25  $\mu$ g de KLH. Además, cada animal recibió 10000 UI/ratón de GM-CSF el día de la inmunización y los tres días siguientes. El número de vacunas que recibieron los animales varió según los experimentos. En los experimentos en los que se utilizaron CD los animales recibieron tres dosis de  $1 \times 10^6$  células/ratón por vía intraperitoneal pulsadas con Id. En los experimentos en los que se utilizaron anticuerpos monoclonales la dosis utilizada fue de 150 mg/ratón.

Para valorar la respuesta celular inducida tras la vacunación se realizaron test de proliferación, ELISA, ELISPOT y citotoxicidad. Para valorar la respuesta humoral se realizaron test de ELISA.

## RESULTADOS

Estudios de protección en A20. Los animales se vacunaron por vía subcutánea dos veces (el día 0 y el día 7) antes de la inoculación del tumor (el día 14). Los resultados mostraron que aunque este protocolo no protegía a los animales del desarrollo del tumor, sí retrasaba su crecimiento. La formulación más efectiva fue Id-KLH.

Estudios de protección en HOPC-1F. Los animales se vacunaron por vía subcutánea cuatro veces (el día 0, 7, 14 y 21) antes de la inoculación del tumor (el día 28). 129 días después de la inoculación del tumor, un 86% de los animales vacunados con Id-KLH permanecieron libres de tumor; igualmente un 58% de los vacunados con Id+KLH, un 44% de los vacunados con Id, un 20% de los controles que recibieron sólo GM-CSF y un 16% de los controles vacunados con suero fisiológico. Por lo tanto, con estos resultados se puede concluir que cuatro vacunas antes de la inoculación del tumor inducen una respuesta inmune que frena el crecimiento tumoral siendo el Id-KLH la formulación más eficaz. En el análisis de la respuesta inmune no se observó activación específica frente a Id, ni de linfocitos T helper, ni de linfocitos T citotóxicos en ninguno de los animales. Sin embargo, el 86% y el 29% de los animales vacunados con Id-KLH e Id respectivamente presentaban anticuerpos específicos del Id.

Estudios de tratamiento en HOPC-1F. En los estudios de tratamiento no se observó eficacia ni para los protocolos basados en CD ni para los basados en vacuna idiótipica "clásica". Sin embargo, con uno de los anticuerpos monoclonales, el anti-CTLA-4 se consiguió que un 40% de los animales rechazaran el tumor. Además, la combinación de la vacuna idiótipica con ciclofosfamida que es una droga citotóxica hizo que un 40% de los animales tratados rechazaran el tumor.

## DISCUSIÓN

El LF es una neoplasia hematológica de linfocitos B actualmente incurable. Se caracteriza por crecimiento lento, por responder muy bien a los tratamientos de radioterapia y de quimioterapia y por presentar recaídas frecuentes. El MM también es una neoplasia hematológica caracterizada por la proliferación clonal de linfocitos B en el último estadio de maduración (células plasmáticas) que producen una Ig monoclonal tumor-específica. Clínicamente es una enfermedad caracterizada por la progresión a pesar de regímenes de quimioterápicos agresivos. Por ello, es necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos para ambas patologías entre los que se encuentra la inmunoterapia.

De los resultados obtenidos en los experimentos de protección en A20 se puede concluir que son necesarias varias dosis de vacuna y que la mejor combinación es el Id-KLH. Estos datos junto con los obtenidos en el protocolo asistencial realizado en nuestro laboratorio en los últimos cuatro años hacen pensar que la combinación de quimioterapia con la vacunación idiótipica prolongada en el tiempo puede ser el futuro en la curación del LF. De hecho, en nuestro laboratorio ya se está diseñando un ensayo clínico con estas características. En los experimentos realizados en HOPC-1F se observa que a varias dosis de Id-KLH protegen del tumor. Sin embargo, a nivel terapéutico es necesario también su combinación con quimioterapia u otras posibilidades inmunoterápicas como son los anticuerpos monoclonales.

## **Análisis de nuevas translocaciones cromosómicas en síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos y en enfermedades mieloproliferativas crónicas. Identificación y caracterización de los genes implicados. Significación clínica**

**J.L. Vizmanos**

Departamento de Genética. Universidad de Navarra. Pamplona.

### **FUNDAMENTO**

En los últimos años se ha demostrado que el cáncer es una enfermedad de base genética originada por la aparición de distintos tipos de mutaciones en genes implicados en la proliferación celular. Así, determinados tipos de tumores pueden ser diagnosticados, clasificados y tratados según el perfil de las alteraciones genéticas que presenten, las cuales están dando importantes pistas para el desarrollo de nuevas terapias.

Las neoplasias hematológicas son, desde este punto de vista, un ejemplo paradigmático de cómo la descripción de las alteraciones genéticas subyacentes pueden conducir, si no a la curación, si al menos al control de la enfermedad y a la mejora de la calidad de vida de los pacientes que las sufren. En éstas, el análisis de alteraciones cromosómicas recurrentes, especialmente translocaciones suministra una información vital para el tratamiento de la enfermedad neoplásica.

Una de las familias de genes más afectados por estas alteraciones son los que codifican para proteínas de actividad tirosinquinasa (PTK). Se conocen cerca de 100 genes distintos en mamíferos que pueden agruparse en dos grandes familias, los receptores de membrana (RTKs) y las citoplasmáticas (CTKs). Ambas son importantes en las cascadas de señalización intracelular y están involucradas en los sistemas de regulación de la diferenciación, crecimiento y muerte celular. Además se han mostrado alteradas en múltiples tipos de tumores, lo que ha provocado un gran interés en esta familia de proteínas como objetivo terapéutico. Las PTKs actúan como oncogenes y existen varios mecanismos genéticos que provocan su activación anómala.

La LMC es una neoplasia de características crónicas que afecta a la serie celular mioide de la sangre. Su causa es la fusión BCR-ABL1 consecuencia de la t (9; 22) (q34; q11). Sin embargo existen otras enfermedades muy relacionadas que no presentan esta alteración: son los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPC) BCR-ABL negativos, un conjunto heterogéneo de leucemias crónicas muestran características clínicas variadas de difícil diagnóstico y tratamiento. Son enfermedades clonales caracterizadas por una proliferación excesiva de células de uno o más linajes mieloides. En algunos casos se han observado translocaciones únicas que afectan genes codificantes de proteínas con actividad TK.

Hay razones que hacen pensar que la activación de las vías de transducción de señales en las que están implicadas proteínas con actividad TK es más frecuente que lo descrito hasta la fecha en los SMPC por lo

que, tanto el análisis de nuevas translocaciones como el análisis masivo de genes con actividad TK en este tipo de enfermedades puede conducir a la identificación de nuevas alteraciones.

### **MATERIAL Y MÉTODO**

Se han analizado varias translocaciones cromosómicas encontradas en pacientes con neoplasias hematológicas mieloides como alteraciones únicas y, presumiblemente, causantes del proceso neoplásico, así como la incidencia en varias series de nuevas alteraciones que afectan a estos genes y que han sido descritas en los últimos dos años. En concreto se han analizado la t (8; 16) (p11; p13); la t (9; 16) (q34; q22); la t (4; 13) (q12-21; q12-q14); la t (5; 14) (q33; q24) y la t (6; 8)(q27; p12). Además se ha llevado a cabo la puesta a punto del análisis de la fusión críptica FIP1L1-PDGFR mediante RT-PCR y FISH y el estudio de la incidencia de la mutación V617F de *JAK2* en una serie de pacientes con síndromes mieloproliferativos crónicos BCR-ABL negativos clásicos y la creación de un banco de sondas FISH para el análisis masivo de alteraciones crípticas que afectan a varios genes con actividad TK. Para todo ello se han utilizado técnicas de citogenética convencional, citogenética molecular, biología molecular y bioinformática.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La t (8; 16) (p11; p13) analizada se encontró en un paciente con leucemia mioide aguda monocítica (FAB M5b) secundaria a tratamiento con epidodofilotoxinas con características clínico-morfológicas levemente distintas a las encontradas hasta entonces.

En un paciente pediátrico con leucemia aguda linfobástica T se encontró como alteración única la t (9; 16) (q34; q22), descrita por vez primera. Los resultados de los análisis FISH realizados fueron contradictorios y no se pudo caracterizar a nivel molecular la afectación de los genes candidatos (CBFB, NUP214, TRADD y HSF4).

La t (4; 13) (q12-21; q12-q14), descrita también por vez primera, se encontró en un paciente con síndrome mielodisplásico en transformación. De nuevo, fue imposible caracterizar la translocación a nivel molecular.

La t (5; 14) (q33; q24) encontrada en un paciente con un síndrome mieloproliferativo BCR-ABL negativo supuso la caracterización molecular de la séptima translocación que afectaba al gen PDGFRB, con importantes consecuencias para el tratamiento y monitorización molecular de este tipo de pacientes

El análisis de la fusión críptica FIP1L1-PDGFR $\alpha$  en una serie de pacientes con hipereosinofilia mostró que hay casos en los cuales ésta puede estar causada por otros mecanismos, algunos de los cuales permanecen por caracterizar.

La t(6;8)(q27;p12) es una translocación muy rara que encontramos en dos pacientes con características clínicas distintas a las publicadas. Su análisis condujo a la conclusión de que enfermedades como la policitemia vera podrían estar causadas por alteraciones en alguna vía de señalización celular, sugiriendo que defectos en moléculas de actividad tirosínquinasa podrían ser la causa molecular de la PV. Hipótesis que ha sido finalmente demostrada por otros grupos.

Además, el análisis de la incidencia de la mutación V617F de JAK2 en una serie de 349 pacientes con síndromes mieloproliferativos crónicos BCR-ABL negativos incluye la mayor serie de trombocitemias esenciales estudiadas hasta la fecha. Este estudio ha reafirmado la idea de la existencia de un exceso significativo de varones en los casos con PV sin esta mutación y la naturaleza clonal de algunos de los casos sin la mutación. Todo ello pone de manifiesto la necesidad de nuevos análisis en los genes TK o en las vías de transducción de señal en los que participan con el objeto de encontrar las alteraciones genéticas que conducen a este tipo de enfermedades en los casos que permanecen si caracterizar.

---

## Caracterización, regulación y control de biofilms producidos por *Salmonella typhi* y *Salmonellae* no-typhi. Repercusiones en la patogénesis y cronificación

**C. Gamazo, B. García, C. Latasa, C. Solano, M. Hidalgo, B. Sesma, M. Álvarez, I. Lasa**

Departamento de Microbiología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Unidad de Biofilms. Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales. Pamplona.

Laboratorio de Microbiología. Ayuntamiento de Pamplona. Pamplona.

### FUNDAMENTO

Los biofilms parecen estar implicados en, al menos, el 65% de las infecciones bacterianas. Un biofilm es una agrupación de bacterias embebidas en una matriz de naturaleza heterogénea, generalmente polisacáridica, que favorece la adherencia (colonización) y supervivencia sobre superficies. El conocimiento de los mecanismos implicados en la formación de los biofilms ayudará a aplicar medidas de prevención y tratamientos específicos. Nuestro grupo de trabajo ha realizado el trabajo que resumimos a continuación, con los siguientes objetivos principales: estudiar la capacidad de formación de biofilm por diferentes aislamientos de *Salmonella enteritidis* y *S. typhi*, así como identificar los genes implicados y su regulación.

### MATERIAL Y MÉTODO

Cepas bacterianas. Las cepas de *Salmonella* estudiadas procedieron de aislamientos clínicos y ambientales procedentes de la colección de cepas de los diferentes Departamentos involucrados.

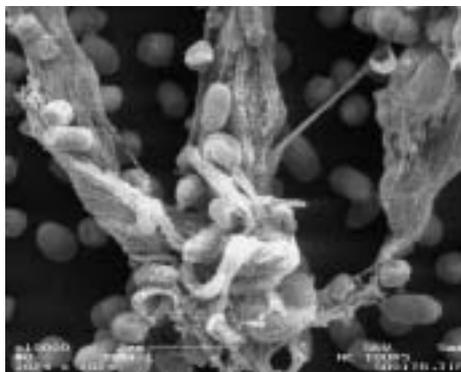
Formación de Biofilms. Las condiciones óptimas para la formación de biofilms fueron las siguientes. Biofilm-ATM: las cepas procedentes de TSA 2% glucosa se incubaron en el medio ATM (*Adherence Test Medium*) a 37°C con agitación, 3 h. Biofilm-LB: 3-4 días de incubación en reposo en medio *Luria-Bertani* (LB) a temperatura ambiente y sin agitación.

Mutagénesis. Mutagénesis por transposición sobre la cepa *S. enteritidis* 3934, utilizando el transposón defectivo mini-MudJ localizado en el operón de la histidina de la cepa TT10288. Una vez realizada la mutagénesis se analizó la capacidad de formar biofilm de aproximadamente 10.000 transductantes resistentes a la kanamicina e Histidina<sup>+</sup>. A continuación, se llevó a cabo la extracción y purificación de DNA cromosómico y la posterior secuenciación de las regiones adyacentes al transposón empleando dideoxinucleótidos marcados con distintos fluorocromos. El producto de esta reacción se resolvió en un secuenciador capilar. Con objeto de identificar la proteína afectada por el transposón, se compararon las secuencias con las presentes en una base Genbank del NCBI.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que la capacidad de formar biofilm está muy extendida entre los aislamientos naturales de *S. enteritidis* y que esto permite la supervivencia de *Salmonella* en hábitats naturales. También se observó que estos microorganismos son capaces de formar biofilm en diferentes condiciones ambientales y su composición depende de estas condiciones. Así, en un medio rico, LB (temperatura ambiente) se forma una película en la interfase medio aire formada por varios componentes estructurales, predominando la celulosa (aparición de fibras

mediante microscopía electrónica, figura 1). Sin embargo, en el medio ATM, deficiente en nutrientes (37°C) el biofilm que se forma parece estar compuesto exclusivamente por celulosa.

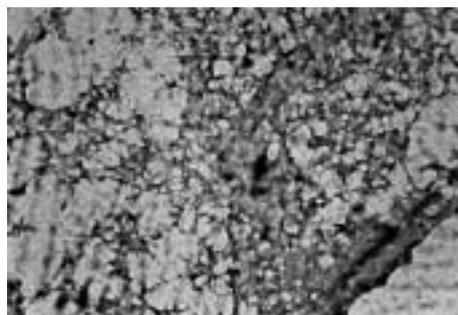


**Figura 1.** Biofilm de *Salmonella enteritidis* (cepa 3934) producido en medio LB (22°C). Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido. Se observa la presencia de redes fibrilares (matriz de celulosa), sintetizadas por las propias bacterias (x 10.000).

Los estudios genéticos avalan estos datos. Mutaciones en genes implicados en la síntesis de polisacáridos, lipopolisacárido, antígeno común de enterobacterias, del metabolismo energético, adhesinas, movilidad y síntesis de pirimidinas y aminoácidos hacen a *S. enteritidis* incapaz de formar biofilm en LB pero todavía le permiten formar biofilm en ATM. Pero lo más sorprendente fue observar que todos los mutantes en la región intergénica entre *dctA* y *dppF*, de función desconocida hasta ese momento, eran incapaces de formar biofilm en ATM. El análisis de las secuencias reveló que las regiones intergénicas *dctA-dppF* presenta dos operones necesarios para la síntesis de celulosa, por lo que los hemos renombrado como *bcsABZC* y *bcsEFG*. En cuanto a su regulación,

nuestros resultados confirman que el regulador transcripcional *mlrA* es necesario para la formación del biofilm y la producción de celulosa en LB. Sin embargo, *mlrA* no es necesario para la formación de biofilm en ATM. Además, la síntesis de celulosa en *S. typhimurium* se da sólo cuando está presente el gen *adrA*, proteína de membrana con un dominio GGDEF y que está regulada por *agfD*.

Finalmente, hemos demostrado que *Salmonella* no sólo es resistente a las sales biliares (mediada por, al menos, la síntesis de celulosa), sino que además en su presencia se activan los mecanismos inductores de formación de biofilm. Es más, *S. typhi* únicamente fue capaz de formar biofilm cuando se incubó con taurocolato sódico (Fig. 2). La resistencia de *S. typhi* a las sales biliares en la vesícula biliar, la posterior activación de los genes implicados en la formación de biofilm, y la formación de éste sobre los cálculos biliares favorecería su persistencia en el huésped, convirtiendo a este patógeno en un problema recurrente.



**Figura 2.** Biofilm de *Salmonella typhi* (cepa 567) producido en medio LB suplementado con ácido taurocólico (37°C). Imagen obtenida mediante microscopía óptica (tinción de Gram y contraste de fases). Se observa la presencia de redes fibrilares en donde se encuentran embebidas las bacterias (x 1000).

## Evaluación de mecanismos de respuesta a radioterapia y pronósticos en carcinoma escamoso de cabeza y cuello

**B. Honorato<sup>2</sup>, J. M. Alcalde<sup>1</sup>, J. M. García-Foncillas<sup>2</sup>**

1. Servicio de Otorrinolaringología. Clínica Universitaria de Navarra.
2. Laboratorio de Biotecnología. Clínica Universitaria de Navarra.

### FUNDAMENTOS DEL PROYECTO

En el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello hay varias opciones terapéuticas: cirugía, cirugía con braquiterapia y quimio-radioterapia más cirugía. En todos los casos el paciente corre el riesgo de desarrollar tanto recidivas locales como metástasis distales. Así mismo, hay diferencias importantes en la sensibilidad al tratamiento entre los distintos casos, sobre todo en estadios tardíos de la enfermedad (III y IV).

Este proyecto busca establecer variables moleculares que definan la quimio-radioresistencia medida en términos de fallo local (recidiva local) y a distancia (desarrollo de metástasis). Para ello se van a analizar en muestras de tumor la expresión de los genes XPA, XPB, XRCC1, TGF $\beta$  TAK1 pertenecientes a los sistemas de reparación del DNA. También se estimará la presencia de los distintos polimorfismos en el gen XRCC1 y de mutaciones/polimorfismos en el gen supresor tumoral smad4 en relación a la resistencia al tratamiento. Este análisis se realizará en DNA de línea germinal. Se determinará la presencia de células tumorales circulantes en sangre periférica como marcador pronóstico mediante la cuantificación de la expresión de los marcadores tumorales E48, EGFR, elF4-e y CK-19 para el control de enfermedad mínima residual.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez obtenido el consentimiento informado del paciente se recogieron muestras de tumor y de sangre periférica de 59 pacientes diagnosticados con cáncer escamoso de cabeza y cuello en estadio avanzado y sometidos a tratamiento de quimio-radioterapia. La extracción de ADN de línea germinal a partir de sangre se lleva a cabo en la estación automatizada de extracción de ácidos nucleicos MagNA Pure LC de Roche Diagnostics. La extracción de ARN tumoral se realizó empleando un protocolo mixto que emplea el reactivo Trizol® y el kit de extracción de ARN RNA easy minikit (Qiagen) sometiéndose inmediatamente a reacción de retrotranscripción (muLV Reverse Transcriptase Applied Biosystems) para obtener el ADN complementario (ADNc) Para el diseño de los cebadores necesarios se empleó el programa Primer Express™ v1.1 (ABI PRISM™ Applied Biosystems). Para la secuenciación de los genes XRCC1 y SMAD4 se empleó el método Sanger en un secuenciador automático ABI PRISM™ 377 ADN Sequencer. El ADNc obtenido a partir de las muestras de tejido tumoral se empleó para la cuantificación de la expresión de los factores en estudio mediante la técnica

de PCR en tiempo real empleando la tecnología Taqman en el termociclador de tiempo real ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems).

### RESULTADOS

En el estudio de expresión en tejido tumoral se observó que la expresión del ARN mensajero de los factores DNAPK, XPB, TAK1 y P53R2 es significativamente muy superior en los pacientes que presentan respuesta al tratamiento frente a los pacientes que no responden ( $P < 0,01$ ). Los pacientes vivos con evidencia de enfermedad mostraron niveles de expresión de XRCC1 superiores a aquellos fallecidos con enfermedad ( $P < 0,05$ ).

El análisis de marcadores predictivos de metástasis en sangre periférica ha revelado que los niveles de ARN mensajero del gen E48 son más elevados en los pacientes que desarrollan recidivas locales que en los que no ( $P < 0,05$ ) desarrollan.

### DISCUSIÓN

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión del ARN mensajero de los factores DNAPK, XPB, TAK1, P53R2 y XRCC1 forma parte de un panel de reacciones al tratamiento aplicado que, o bien muestran que la célula tumoral es receptiva a los agentes antitumorales, o bien potencia su efecto facilitando una respuesta positiva. Los genes DNAPK, XPB y XRCC1 son representantes cada uno de un mecanismo distinto de reparación del ADN: los sistemas DSB, NER y VER. La expresión del gen P53R2 es inducida por varias señales de estrés que activan p53, tales como los daños causados en el ADN por agentes como la quimioterapia y la radiación ionizante. TAK1 Es un factor fundamental de la vía antiapoptótica desencadenada por TGF- $\beta$ 1 que activa el factor JNK1.

La sobreexpresión del ARN mensajero de estos factores podría indicar una mayor estimulación de los sistemas de respuesta al tratamiento de la célula tumoral. Otra explicación más ajustada podría referirse a la reacción celular frente al daño masivo, siendo la activación de los mecanismos de reparación del ADN un paso previo a la muerte celular programada.

El análisis del ratio de expresión E48/ $\beta$ Actina en sangre periférica muestra resultados muy prometedores, animando a la búsqueda de un valor óptimo de expresión a partir del cual pueda llegar predecirse un mayor riesgo de padecer recidivas locales.

## Enfermedad de Parkinson y demencia: ¿es la homocisteína un factor etiopatogénico en la extensión del proceso neurodegenerativo?

**M.C. Rodríguez Oroz**

Centro de Investigación Médica Aplicada. Pamplona.

### FUNDAMENTO

La demencia en la enfermedad de Parkinson (EP) es una complicación frecuente (70% de pacientes) a mediano-largo plazo. Niveles plasmáticos elevados de homocisteína (Hc) se han asociado con demencia y con enfermedad de Alzheimer. Los pacientes con EP presentan concentraciones plasmáticas altas de Hc ya que ésta es un metabolito de la levodopa, que constituye el principal tratamiento de la EP. Por tanto, la hiperhomocistinemia crónica que estos pacientes presentan podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de demencia en la EP.

En este trabajo estudiamos si los niveles de Hc en los pacientes con EP y demencia están más elevados que en los pacientes con EP sin demencia, así como su relación con otros factores relacionados con el metabolismo de la Hc (vitaminas B12 y B6, ácido fólico) y la existencia de lesiones vasculares cerebrales y/o mayor grado de atrofia cortical.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se han incluido 66 pacientes con enfermedad de Parkinson (EP) y 30 sujetos control. Los sujetos controles fueron seleccionados de una muestra de 100 sujetos normales (sin evidencia de enfermedad neurológica, psiquiátrica o sistémica y normalidad en la evaluación neuropsicológica). Los pacientes con EP se subdividieron de acuerdo con la evidencia o no de deterioro cognitivo ligero (DCL) y de demencia. Todos tenían más de 10 años de evolución de EP y más de 65 años. El diagnóstico de demencia se estableció siguiendo los criterios DSM-IV y el de DCL según los criterios de Petersen, que considera dentro de esta categoría aquellos pacientes sin criterios de demencia (DSM-IV), con función cognitiva global normal, queja subjetiva de fallos de memoria, rendimiento anormal en al menos uno de los tests de memoria, pero sin repercusión en las actividades de la vida diaria. Se excluyeron pacientes con enfermedad vascular conocida, enfermedades metabólicas graves, enfermedades psiquiátricas, antecedentes de cirugía cerebral y patología vascular cerebral silente (mediante resonancia magnética cerebral) y aquellos tomando vitamina B, ácido fólico o fármacos inhibidores de la COMT.

Se realizaron las siguientes evaluaciones:

Estudio neuropsicológico. Incluyó la siguiente batería: 1. MMSE (Mini mental state de Folstein), 2. Escala cognitiva de Blessed, 3. Escala de actividades de la vida diaria-IDD-, 4. Escala de depresión geriátrica GDS de Yesavage, 5. WAIS III Subtest de historietas, 6. Copia y recuerdo de figuras geométricas, 7. Test de fluencia de categorías semántica (Animales) y fonética (p), 8. Test de recuerdo libre y con pistas (Buschke), 9. Test de denominación de Boston, 10. Stroop test, 11. Lista de palabras Cerad, 12. Trail making test A y B, 13.

Matrices progresivas de Raven (escala de color), 14. Test de clasificación de tarjetas de Wisconsin.

Bioquímica: determinaciones en sangre de los niveles de homocisteína, vitaminas B12 y B6 y ácido fólico.

Resonancia magnética cerebral. El protocolo de adquisición de imágenes de RM incluye además una secuencia especial para análisis volumétrico. El estudio de atrofia se realizó mediante volumetría de hipocampo sobre la RM cerebral en la que se delimitaron regiones de interés incluyendo la corteza entorrinal (CE) y la corteza que configura el surco temporal superior (STS). Se han elegido dichas regiones al ser las que han resultado más discriminativas en estudios previos de demencia en EA y demencia con cuerpos de Lewy cuyas características clínica y patológicas son indistinguibles de la EP con demencia.

Análisis estadístico de los datos

Se aplicó un ANOVA para muestras repetidas para el estudio evolutivo. En el estudio transversal, la comparación entre grupos de los niveles plasmáticos de cada una de las variables determinadas se realizó mediante ANOVA de una vía. Los análisis *post-hoc* se realizaron con el test de Bonferroni. Las correlaciones entre los niveles de Hc y el resto de variables se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. El nivel de significación fue  $p < 0,05$ . El estudio se realizó con el programa SPSS 9,0.

### RESULTADOS

De los pacientes incluidos 30 cumplían criterios de EP sin demencia, 30 de EP con demencia y 8 de EP con deterioro cognitivo ligero.

No existieron diferencias en las características generales entre los 4 grupos, excepto en la edad al momento del estudio que fue significativamente superior en los pacientes con demencia ( $p < 0,05$ ) y en la edad de inicio de la enfermedad, que fue mayor en el grupo de pacientes con demencia comparado con aquellos sin deterioro cognitivo (ANOVA, "post-hoc",  $p < 0,05$ ) (Tabla 1). El número de hombres y mujeres incluido en cada grupo fue semejante.

Todos los grupos de pacientes con EP tuvieron una concentración plasmática de Hc mayor que el grupo control ( $p < 0,01$ ). La Hc fue mayor en el grupo de pacientes con EP y DCL que en el grupo de pacientes con EP sin demencia ( $p = 0,014$ ) (Fig. 1). No hubo diferencias significativas entre la Hc del grupo de pacientes con DCL y con demencia ( $p = 0,052$ ) ni entre sexos ( $16,1 \pm 5,7$  en hombres vs.  $14,6 \pm 5,9$  en mujeres).

Las concentraciones plasmáticas de Vit B12, Vit B6 y ácido fólico y el consumo diario de levodopa no mostraron diferencias significativas entre los grupos de

**Tabla 1.** Resumen de los datos obtenidos en cada grupo estudiado.

	Controles (n=30)	EP sin demencia (n=22)	EP con DCL (n=19)	EP con Demencia (n=28)
Edad	72±3,2	67,63±7,01	70±5,47	75±6,1
Homocisteína (µmol/L)	8,45±2,06	14,44±4,9	20,72±8,09	15,26±5,54
Vit B12 (pg/ml)	456,26±240,63	452,38±253,13	356,15±216,72	400,92±270,05
Ac Fólico (ng/ml)	9,89±3,96	9,70±4,1	10,44±3,10	9,96±4,20
Vit B6 (pg/ml)	58,23±40,27	61,47±40,32	45,30±34,55	45,26±49,01
Edad de inicio		53,09± 5,78	56,95±6,45	60,18±7,44
Años evolución		14,55±3,5	13,21±3,92	15,14±4,24
Levodopa/día		707,72±260,73	872,63±408,88	754,73±321,99

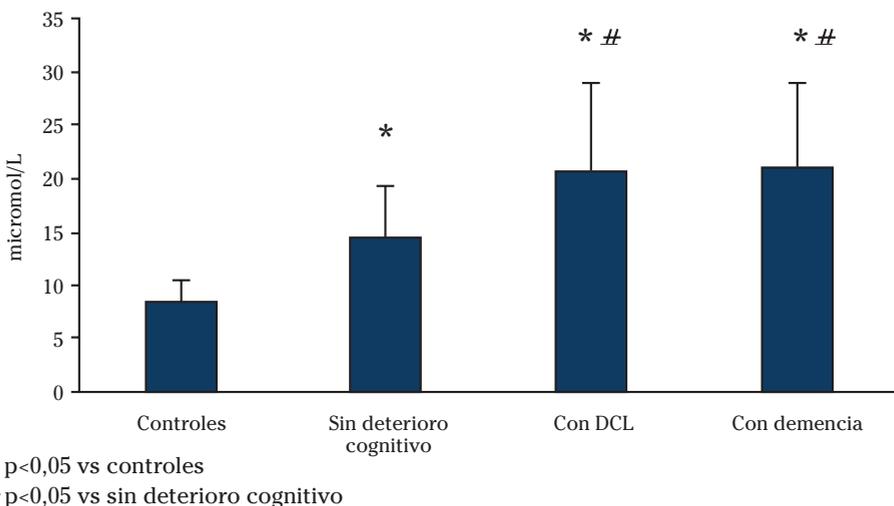
pacientes. Los niveles plasmáticos de homocisteína se correlacionaron positivamente con el consumo diario de levodopa ( $r=0,241$ ,  $p<0,05$ ) y la edad ( $r=0,286$ ,  $p<0,05$ ) y negativamente con la concentración sérica de Vit B12 ( $r=-0,294$ ,  $p<0,05$ ) y Vit B6 ( $r=-0,329$ ,  $p<0,05$ ).

Resonancia magnética cerebral. Los pacientes con EP y demencia y con EP y DCL mostraron una atrofia de hipocampo significativamente mayor que los pacientes con EP sin demencia y los controles ( $p>0,05$ ). No hubo diferencias entre los pacientes con demencia y DCL. Hubo una correlación negativa ( $r=-0,28$ ,  $p<0,05$ ) entre el volumen del córtex entorrinal y la concentración de Hc y la edad ( $r=-0,305$ ,  $p<0,05$ ). No es significativa la relación entre los niveles de Hc y el grado de lesiones vasculares.

### CONCLUSIONES

Los pacientes con EP que reciben tratamiento con levodopa presentan concentraciones plasmáticas de Hc mayores que los sujetos controles, que se correlaciona con el consumo diario de levodopa. No

se han encontrado diferencias entre los grupos en el resto de metabolitos estudiados. La Hc plasmática elevada es un factor de riesgo para el desarrollo de deterioro cognitivo en la EP ya que está elevada tanto en los pacientes con demencia como en aquellos clasificados como DCL. Por otra parte se ha observado que los pacientes con deterioro cognitivo presentan una atrofia de hipocampo mayor que los no dementes y que se correlaciona positivamente con el nivel de Hc plasmática. Así pues, es posible que en la EP exista una subpoblación de riesgo para el desarrollo de demencia a largo plazo en la que los niveles de Hc derivados del tratamiento crónico con levodopa juegan un papel como factor determinante o más posiblemente en asociación con otros factores. En este sentido, la administración de tratamientos que reduzcan los niveles de Hc podría prevenir o retrasar el deterioro cognitivo. Determinar la población de riesgo a través de estudios genéticos es el siguiente paso que permitiría un abordaje más selectivo de la prevención de la demencia en la EP.

**Figura 1.** Concentraciones plasmáticas de homocisteína en los distintos grupos.

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

J.I. García-Bolao

Dpto. de Cardiología. Clínica Universitaria. Pamplona

### OBJECTIVE

We have investigated whether the serum level of the carboxy-terminal propeptide of procollagen type I (PICP), a marker of cardiac collagen type I synthesis and deposition, is related to the long-term response to cardiac resynchronization therapy (CRT).

CRT is an effective treatment for refractory heart failure (HF). However, its mechanism is not completely understood and up to 30% of patients do not respond to CRT.

### METHODS

The study was performed in 38 HF patients with classical indication for CRT and successfully implanted. Clinical and echocardiographic evaluation, as well as determination of serum PICP, were performed at baseline and at 1-year of follow-up.

### RESULTS

Twenty-six (68%) patients were responders to CRT and 12 (32%) nonresponders. At baseline serum PICP was higher ( $P < 0.001$ ) in responders ( $101 \pm 34$   $\mu\text{g/L}$ ) than in nonresponders ( $57 \pm 18$   $\mu\text{g/L}$ ) and controls ( $67 \pm 9$   $\mu\text{g/L}$ ). Nonresponders exhibited higher ( $P < 0.05$ ) left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) and lower ( $P < 0.05$ ) septal-to-lateral wall motion delay than responders. At 1-year of follow-up, serum PICP decreased ( $P < 0.005$ ) in responders ( $82 \pm 21$   $\mu\text{g/L}$ ), while increased ( $P < 0.005$ ) in nonresponders ( $91 \pm 34$   $\mu\text{g/L}$ ). Significant associations were observed between a positive response to CRT and high baseline values of PICP

( $> 73$   $\mu\text{g/L}$ ) ( $\chi^2 = 16.29$ ,  $P < 0.001$ ) and low baseline values of LVEDD ( $< 67.5$  mm) ( $\chi^2 = 5.37$ ,  $P < 0.05$ ) in all patients. However, logistic regression analysis showed that the only independent predictor of a positive response to CRT was PICP (odds ratio: 13.9, 95% confidence interval 7 to 97;  $P < 0.001$ ). The accuracy of the model was confirmed by the non-significant Hosmer-Lemeshow goodness of the fit test ( $P = 0.796$ ). Using receiver operating characteristic curves, we observed that a cut off of 73  $\mu\text{g/L}$  for PICP provided 83% specificity and 85% sensitivity for predicting a positive response to CRT with an odds ratio of 27.5 (95% CI 4.3 to 175.7,  $P < 0.001$ ).

### CONCLUSIONS

(1) An association exists between abnormally high baseline serum PICP levels and a positive long-term response to CRT in HF patients. (2) Whereas the beneficial effects of CRT in HF patients are associated with its ability to normalize serum PICP, the lack of benefit is associated with enhancement of serum PICP. (3) Serum PICP is more accurate than some echocardiographic parameters and NT-proBNP in the prediction of a positive long-term response to CRT in HF patients.

The findings of this pilot study suggest that limitation of the excessive cardiac synthesis and deposition of collagen type I fibrils may be one of the mechanisms contributing to the long-term beneficial effects of CRT in HF patients. In addition, serum PICP may be an accurate predictor of long-term response to CRT in these patients.

