

Detección precoz de cáncer colorrectal en el área de Estella con test de sangre oculta en heces (test inmunológico). Estudio sociológico sobre la/no participación

B. Martínez

Servicio de Aparato Digestivo. Hospital de Navarra. Pamplona.

FUNDAMENTOS

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más frecuentes en los países occidentales. Es una causa importante de morbi-mortalidad con tendencia al aumento en los últimos años. Existe controversia en torno a cuál o cuáles son las técnicas de screening que mayores beneficios aportan. La realización del test de sangre oculta en heces (TSOH), como primer paso del screening se acompaña de un descenso de la mortalidad en múltiples estudios.

En los últimos años se viene utilizando la determinación de TSOH mediante técnica inmunológica que detecta la hemoglobina humana, sin sufrir reacciones cruzadas con alimentos, ni fármacos.

El trabajo tiene como objetivo principal, contribuir al descenso de la mortalidad por CCR en Navarra y medir la aceptabilidad y factibilidad en el Área de Salud de Estella.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio de intervención sobre una muestra de población, mediante la realización de una prueba de screening que consiste en la realización de TSOH, con posterior realización de estudios endoscópicos y/o radiológicos a los individuos con resultado positivo.

Se incluyeron personas asintomáticas de ambos sexos, con edades comprendidas entre 50 y 75 años, con TIS en Navarra, dentro del Área de Estella. La unidad de muestreo es el cupo correspondiente a cada uno de los médicos del Área de Estella.

Se seleccionaron tres cupos de médicos de Atención Primaria, dos de ámbito urbano y uno rural, motivados por fácil accesibilidad, actitud positiva de los profesionales, cupos representativos de zonas urbanas y rurales.

Se establecieron unos criterios de exclusión:

1. Antecedentes personales de pólipos.
2. Antecedentes personales de neoplasia de colon.
3. Exploración endoscópica del colon en los últimos 5 años.
4. Antecedentes personales de EII (colitis ulcerosa, Crohn).
5. Enfermedad terminal o incapacitante.
6. Enfermedad psiquiátrica severa.
7. Tratamiento con anticoagulantes.

La citación se realizó por correo, charlas informativas y recaptación telefónica.

Se realizó la detección de sangre oculta en heces con test inmunológico (Hexagon) y a los resultados positivos se les practicaron estudios endoscópicos.

Se formaron tres grupos para realizar estudio de las causas de la/no participación en el estudio.

Grupo 1. Formado por personas seleccionadas para el programa y que habiendo sido citadas, no acudieron a la consulta inicial, ni a ninguna de las captaciones posteriores.

Grupo 2. Formado por personas seleccionadas para el programa y que habiendo sido citadas, acudieron a la consulta inicial.

Grupo 3. Formado por personas seleccionadas para el programa y que habiendo sido citadas, no acudieron a la consulta inicial, pero que sí lo hicieron tras la recaptación telefónica.

RESULTADOS

La población preseleccionada fueron 1.516 personas, excluidos por base de datos incorrecta 102, distribuidos de la siguiente manera: 30 vivían fuera de la zona de estudio, 38 por dirección no localizada, 30 éxitus, 4 no TIS, no Historia Clínica Informatizada.

De esta manera quedó una población diana de 1.414 personas; de éstos participaron en el estudio 967 (68,39%) y no participaron en el estudio 447 (31,61%).

Según sexo, participaron el 69,08% en varones y un 67,70% de las mujeres. Según franja de edad entre 50-65 años participaron 640 (70,95%), n=902 y en las personas de 65-75 años participaron 327 (63,87%) n=512 (p<0,01), con significación estadística.

La participación en los cupos fue, en los urbanos, en uno participó el 67,8% (n=478); en el otro cupo urbano participó el 66,1% (n=631), sin significación estadística entre ellos; en el cupo rural participó el 74,1% (n=305) (p<0,05) con significación estadística en relación con los cupos urbanos.

La participación inicial en el cribado fue del 56% y tras las charlas informativas y la recaptación telefónica se consiguió un aumento del 12%, no participando el 32%.

De los 967 que participaron fueron excluidos por protocolo 111. Distribuidos de la siguiente manera: exploraciones endoscópicas en los últimos 5 años: 60 personas; tratamiento anticoagulante: 17 personas,

NOTAS INFORMATIVAS

antecedentes de neoplasia de colon y pólipos colónicos: 23 personas, EII (Crohn, Colitis ulcerosa): 7 personas. Discapacidad: 4 personas.

Una vez excluidos los 111 individuos por protocolo, fueron incluidos en el programa 856 personas. De éstas no entregaron el test para valoración de resultados 20 personas; de tal forma que entregaron el TSOH 836 personas, siendo resultados POSITIVOS en 36 casos (4,3%).

Los resultados POSITIVOS, en el caso de varones un 4,6%; n=412, y mujeres un 4%; n=424; según la edad entre 50-65 años el 3,02%; n=563 y de 65-75 años el 6,96%; n=273 ($p<0,01$).

Según cupos urbanos: 4,53%, n=287 y un 3,56%; n=349 y en el cupo de atención primaria rural el 5,5%; n=200.

Se realizaron 32 colonoscopias, dado que 4 personas aun a pesar de la positividad rechazaron los estudios complementarios. Así en estas exploraciones encontramos 3 casos de adenocarcinoma Dukes A y 4 personas con pólipos adenomatosos con displasia epitelial grave, que supone el 19,44 (n=36) y el 21,87% (n=32). El 78% de los pólipos detectados fueron adenomatosos, siendo 14 de ellos de tamaño superior a 1 cm. Un 3% de los pólipos se localizaron en recto, el 12,1% en sigma y el 84,8% resto colon.

CONCLUSIONES

La participación en el programa de screening del CCR en nuestro estudio fue alta el 68,4% si la comparamos con otros cribados. Las charlas informativas y la recaptación telefónica contribuyeron de forma notable al incremento de la participación. No encontramos diferencias significativas en cuanto a la participación según sexo. Hubo mayor participación de los más jóvenes que los mayores con significación estadística. Mayor participación en el medio rural que en el urbano. El TSOH fue POSITIVO en el 4,3% de las personas que entregaron el test. De este 4,3% POSITIVOS fueron diagnosticados de patología tumoral el 19,44%. El 15% de los pólipos se localizaron en región

recto-sigmoidea y el 85% en el resto del colon. No encontramos diferencias significativas en la proporción de TSOH positivos según sexo. El TSOH (test inmunológico) presenta una sensibilidad y especificidad adecuada. El TSOH (test inmunológico) es eficaz en la detección del CCR así como de las lesiones precursoras (pólipos adenomatosos) posibilitando su diagnóstico precoz y tratamiento adecuado de los mismos. Elevada valoración que ha tenido la campaña para la detección precoz del CCR entre los utilizadores de los Servicios Sanitarios, tanto en su versión informativa, como de praxix preventiva. El protocolo de intervención diseñado, habría reforzado la confianza en la Institución Sanitaria y en los profesionales de la salud en la zona objeto de experiencia. En conjunto la satisfacción es elevada, aunque se denote en general una falta de políticas preventivas estructuradas en torno a programas específicos y continuados en el tiempo. El proceso seguido en el protocolo del programa de detección del CCR, información general mediante charlas, derivación personalizada a consulta y la constante llamada al carácter voluntario de la participación actuaría como reactivo de la participación. Refrendo óptimo a los profesionales sanitarios (médicos y enfermería) del nivel explicativo del programa. Factores determinantes de la participación (información, voluntariedad, proximidad con la enfermedad, profesionales sanitarios habituales). En futuras intervenciones, el trabajo de captación y canalización de los procesos deben apoyarse en el equipo de atención primaria, máxime si lo que se pretende es optimizar la participación ciudadana. En relación con la continuidad del programa, existe un consenso en la necesidad de garantizar nuevas secuencias, que de no realizarlas defraudaría algunas de las expectativas creadas por la intervención. Una parte significativa de los participantes en la investigación sociológica es consciente de que este programa supone una experiencia piloto y que su continuidad está ligada al elevado coste económico que tal actividad en términos continuados supondría.

Análisis genético del proceso de formación de biofilms en *Staphylococcus aureus*: identificación de nuevas dianas para el tratamiento de infecciones persistentes sobre implantes

I. Lasa, A. Toledo-Arana, J. Valle, B. García, C. Latasa, M. Vergara, N. Merino, C. Solano

FUNDAMENTO

Staphylococcus aureus es una de las bacterias que con mayor frecuencia causa infecciones asociadas al uso de implantes en el ámbito hospitalario. *S. aureus* es capaz de adherirse a la superficie del implante y formar comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos denominada comúnmente "Biofilm". Dentro del biofilm la bacteria es más resistente a los tratamientos antibióticos y a la acción del sistema inmune. Como consecuencia, las infecciones asociadas a biofilms bacterianos son difíciles de erradicar y en la mayoría de los casos sólo se resuelven con la sustitución del implante contaminado. El desarrollo de nuevos fármacos que o bien eviten la formación del biofilm o desestabilicen un biofilm ya formado requiere la identificación de los genes esenciales implicados en el proceso de formación o mantenimiento del biofilm. Con este objetivo final en mente, iniciamos un proyecto de investigación dedicado al estudio genético del proceso de formación del biofilm por *S. aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Cepas utilizadas, condiciones de cultivo y plásmidos

Staphylococcus aureus 15981, aislada en el Departamento de Microbiología de la Clínica Universitaria de Navarra, fue seleccionada por su origen clínico, por su fenotipo de fuerte formadora de biofilm en TSB pero fenotipo negativo en un medio químicamente definido, por ser sensible a determinados antibióticos y por la posibilidad de aceptar DNA recombinante por electroporación. Las células de *Escherichia coli* XL1-Blue se crecieron en agar LB (Luria-Bertani, Pronadisa, España) con los antibióticos apropiados. Las cepas estafilocócicas se crecieron en diferentes medios: agar soja tripticasina (TSA), agar soja tripticasina suplementado con glucosa (0,25% p/v) (TSB-gluc) y medio químicamente definido (HHW) (M. Debarbouille, Instituto Pasteur). La identificación de los mutantes formadores de biofilm se realizó en placas de ELISA de poliestireno utilizando medio químicamente definido. Los medios fueron suplementados con antibióticos a las siguientes concentraciones: Eritromicina (Erm) 20 µg ml⁻¹ o 1,5 µg ml⁻¹, Ampicilina (Amp) 100 µg ml⁻¹ y Cloranfenicol (Cm) 20 µg ml⁻¹.

- Mutagénesis por transposición

Para la mutagénesis por transposición se utilizó el plásmido pID408 bifuncional, con origen de replicación termosensible para bacterias gram positivas y que contiene el transposón Tn917. Para la identificación de los genes interrumpidos por el Tn917, el DNA cromosómico de cada uno de los mutantes fue digerido con EcoRI y religa-

do en 200 µl de buffer de ligación (Promega) durante 12 horas a 14°C. El producto de la ligación se transformó en *E. coli* y los transformantes se seleccionaron en LB Ampicilina 100 µg/ml. Para identificar los genes interrumpidos por el transposón en cada uno de los mutantes que recuperaron la capacidad de formar biofilm, se secuenciaron los fragmentos adyacentes al transposón utilizando el oligonucleótido pseq que hibrida sobre el extremo final del cassette de eritromicina del transposón. Las secuencias obtenidas se compararon utilizando el programa BLAST 2.0 del servidor NCBI con las bases de datos globales y la base de datos del genoma de *S. aureus*.

- Ensayos de formación de biofilm

El análisis cuantitativo de la formación del biofilm se realizó utilizando un método previamente descrito. Las cepas en estudio se incubaron durante toda la noche en 5 ml de medio. A continuación los cultivos se diluyeron 1:40 en el mismo medio y se incubaron 24 horas a 37°C en pocillos de placas de ELISA de poliestireno (Iwaki, Japan). Tras la incubación y para eliminar las bacterias que no se adhirieron a la superficie del pocillo se lavaron tres veces con 200 µl de PBS. Las bacterias adheridas se tiñeron con cristal violeta durante 10 minutos. La cantidad de bacterias adheridas se calculó midiendo la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro, tras disolver el cristal violeta fijado a las bacterias con una solución de alcohol acetona.

Para el análisis de la formación del biofilm bajo condiciones de flujo continuo se utilizaron microfermentadores. En los microfermentadores hay una renovación constante de medio que evita la acumulación de productos tóxicos en el sobrenadante del cultivo. En el interior del fermentador se introdujeron espátulas de vidrio que sirvieron de sustrato para el desarrollo del biofilm. Las condiciones utilizadas en el microfermentador fueron: flujo continuo de 40 ml/h de medio químico definido, aireación constante (0,3 bar de presión) y una temperatura de 37°C. Para la inoculación las espátulas se sumergieron en un cultivo bacteriano durante 2 minutos y se volvieron a introducir en los microfermentadores. En este sistema las bacterias que crecen en suspensión son lavadas por la aplicación de un flujo continuo y se obtienen únicamente bacterias en biofilm. Para la cuantificación del biofilm a las 24 horas, las bacterias adheridas a la espátula de vidrio se resuspenden en 10 ml de medio químico definido y se mide la densidad óptica a 600 nm.

RESULTADOS

Para llevar a cabo este proyecto necesitábamos seleccionar un aislado clínico de *S. aureus* que fuese manipulable genéticamente y con una fuerte capacidad de producir biofilm *in vitro* y por otro lado establecer la

metodología y las condiciones óptimas de formación del biofilm en el laboratorio. Para ello analizamos la capacidad de formación del biofilm de 63 aislados clínicos de *S. aureus* utilizando cinco ensayos diferentes. En base a los resultados obtenidos seleccionamos el aislado clínico 15.981 como bacteria modelo para el estudio de la formación del biofilm de *S. aureus* y desarrollamos la metodología de análisis del biofilm en condiciones de laboratorio. Seguidamente, utilizamos mutagénesis por transposición para identificar mutantes deficientes en la formación del biofilm en un ensayo sobre placas microtiter. Sorprendentemente, de los 10.000 mutantes analizados, sólo tres mutantes perdían la capacidad de formar biofilm en las distintas condiciones utilizadas. De los tres mutantes, en este proyecto nos hemos centrado en analizar como afecta la mutación del gen *sarA* al proceso de formación del biofilm. Nuestros resultados demuestran que *SarA* es un activador transcripcional del operón *icaADBC*. En su ausencia, se produce una disminución de los niveles de transcripción del operón *ica* y, en consecuencia, de la cantidad de exopolisacárido PIA/PNAG producido. Por otro lado, al estudiar el papel de otros reguladores globales en el proceso de formación del biofilm encontramos que la delección completa del factor de transcripción O^6 no afecta al proceso de formación del biofilm.

Otra parte del proyecto se ha dirigido a estudiar en detalle la relación entre la proteína Bap (*biofilm associated protein*) y el calcio presente en el medio en el que crece la bacteria. Bap es una proteína de superficie identificada por nuestro grupo de investigación que está implicada en la formación del biofilm. La presencia de motivos de unión a calcio (EF-hand domains) nos animó a investigar el efecto del calcio en la formación del biofilm de cepas de *S. aureus* que poseen Bap. Los resultados obtenidos han mostrado que la adición de concentraciones milimolares de calcio al medio de crecimiento inhibe la adherencia intercelular, la formación de agregados en medio líquido y la formación de biofilm. Un efecto similar se obtiene mediante la adición de manganeso pero no con la adición de magnesio. Mediante un proceso de mutagénesis dirigida se cambiaron tres aminoácidos del motivo EF-hand de la proteína Bap en el cromosoma de la bacteria. La cepa recombinante resultante mantenía la capacidad de formar biofilm, pero dicho proceso no se veía afectado por la presencia de calcio en el medio. Estos resultados indican que la formación de biofilm mediada por la proteína Bap está regulada por la presencia de calcio en el medio, y que por tanto es posible modular el proceso de formación del biofilm cambiando las concentraciones de calcio del medio.

DISCUSIÓN

Un análisis general de los resultados obtenidos en este proyecto indica que la formación de biofilm de *S. aureus* es un proceso complejo, energéticamente costoso y que en consecuencia está altamente regulado. De todos los genes identificados como esenciales para el proceso de formación del biofilm, a nuestro juicio destaca *sarA*. La proteína *SarA* es un regulador global de virulencia que regula la expresión de muchos factores de virulencia. Una bacteria mutante en *SarA* es avirulen-

ta en un modelo de infección experimental en ratón. La coincidencia de que este regulador sea esencial para el proceso de formación del biofilm le convierte en un candidato muy interesante como diana para bloquear simultáneamente la virulencia y la formación del biofilm. Creo que es importante señalar que con posterioridad a la publicación de nuestro artículo en el que describimos que *SarA* es esencial para la formación del biofilm de *S. aureus*, han sido publicados dos trabajos independientes por dos grupos americanos en los que se llega a la misma conclusión.

El segundo resultado destacable de nuestro trabajo, es que el medio de cultivo en el que se desarrolla la bacteria condiciona el proceso de formación del biofilm. Nuestro trabajo demuestra que una proteína de superficie, Bap, tiene una conformación terciaria que depende de la presencia de unos niveles de calcio en el medio. Cuando estos niveles de calcio aumentan, la conformación de la proteína se modifica y pierde su capacidad para mediar la adherencia primaria y la formación del biofilm. Las concentraciones que afectan a la formación del biofilm de *S. aureus* se encuentran en el rango de la concentración de calcio libre en la leche y por tanto en un rango de concentraciones no tóxicas. Por tanto parece posible que podamos modular la formación del biofilm o desestabilizar un biofilm ya formado jugando localmente con las concentraciones de calcio del medio.

Otra interesante diana que se deduce de nuestro trabajo son las proteínas con dominio GGDEF. Nuestro trabajo sobre biofilms de *Salmonella*, junto con recientes trabajos de otros autores, indica que la síntesis del exopolisacárido de la matriz del biofilm se regula alostéricamente por una molécula de c-di-GMP. Los niveles de c-di-GMP de la célula dependen de la actividad de dos enzimas, diguanilato ciclasas que intervienen en la síntesis de c-di-GMP y fosfodiesterasas que intervienen en su degradación. Ambas enzimas comparten la presencia de un dominio GGDEF. La secuenciación de los genomas bacterianos ha puesto de manifiesto la presencia de numerosas proteínas con dominio GGDEF en los distintos géneros bacterianos, 39 proteínas con dominio GGDEF en *Pseudomonas*, 41 proteínas en *Vibrio*, 19 en *Escherichia coli*, etc. Llamativamente, *S. aureus* solamente tiene una proteína con dominio GGDEF en su genoma, en el caso de que esta proteína fuese esencial para la síntesis del exopolisacárido del biofilm de *S. aureus*, estaríamos frente a una diana ideal para bloquear específicamente la formación del biofilm de *S. aureus*. En la actualidad estamos realizando la mutación de dicha proteína para determinar su efecto en el proceso de formación del biofilm.

Finalmente, en este trabajo también hemos analizado el papel de los sistemas de fosfotransferencia de dos componentes en el proceso de formación del biofilm. Sorprendentemente, los resultados demuestran que solamente el sistema *arlRS* tiene un efecto en la formación del biofilm. Teniendo en cuenta que estos sistemas adecuan la expresión de los genes a los estímulos externos quizás nuestro estudio no haya sido lo suficientemente exhaustivo para estudiar todas las posibles condiciones y excluir el papel del resto de los sistemas en la formación del biofilm.

Residuos de contaminantes orgánicos de diferentes orígenes en Navarra

P. Fraile, J.A. Pérez de Ciriza, I. Sáiz, E. González, M. Izu

Instituto de Salud Pública. Pamplona.

FUNDAMENTOS

Hay grupos de contaminantes sobre los que hay un interés emergente, y no han sido estudiados de forma sistemática en Navarra. Entre ellos se cuentan los herbicidas, los trihalometanos, y los policlorobifenilos (PCB). Los objetivos que se han establecido para este estudio son los siguientes:

- Analizar PCB en muestras de alimentos, piensos y aguas procedentes de Navarra.
- Analizar trihalometanos en muestras de agua de abastecimiento.
- Analizar residuos de herbicidas en aguas de Navarra.
- Valorar los resultados obtenidos desde el punto de vista del riesgo sobre la Salud Pública.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material. Se utilizaron muestras de agua de abastecimiento, de alimentos y de piensos utilizados en explotaciones ganaderas, procedentes de la Comunidad Autónoma de Navarra.

Métodos de análisis. PCB (16 congéneres) en aguas y alimentos. Las muestras se purificaron mediante tratamiento ácido y alcalino (alimentos) y extracción líquido-líquido (aguas y alimentos), y los extractos obtenidos se analizaron mediante GC-ECD (columna capilar J&W Scientific DB-1701).

Trihalometanos en aguas (cloroformo, bromodibromometano, dibromoclorometano, y bromoformo). Las muestras se purificaron mediante extracción líquido-líquido, y los extractos se analizaron mediante GC-ECD (columna capilar J&W Scientific DB-5).

Herbicidas en agua (2,4-D, metribuzina, metil imazametabenz, cianazina, clortoluron, isoproturon y terbutrina). Las muestras se purificaron mediante extracción en fase sólida; los concentrados se analizaron mediante HPLC-PAD (columna Supelcosil LC8 DB).

Parámetros generales de las aguas (cloro libre *in situ*, pH, conductividad, turbidez, nitros, nitritos, amonio, oxidabilidad al permanganato). Se utilizaron técnicas electroquímicas, volumétricas y colorimétricas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron 106 muestras de agua. Tan sólo se detectaron PCB en dos muestras (0,30 y 0,10 µg/L), que procedían de un abastecimiento provisional del noroeste de Navarra. Una vez restablecido el abastecimiento habitual, los resultados fueron negativos.

Se analizó un total de 66 muestras de alimentos, distribuidos en los siguientes grupos: 24 productos

cárnicos, 13 huevos y ovoproductos, 20 leches y productos lácteos y 9 truchas procedentes de acuicultura. Las únicas muestras de alimentos en las que se hallaron PCB fueron las de trucha; se detectaron estos compuestos en 8 de las 9 muestras analizadas. La concentración de PCB no similares a dioxinas en las muestras de trucha positivas estuvo en el intervalo 21-194 µg/kg de grasa. La concentración de PCB similares a dioxinas en las truchas varió en el intervalo 41-139 µg/kg de grasa.

Se analizaron 107 muestras de grasa animal. Se detectaron PCB no similares a dioxinas tan sólo en 2 muestras. Las concentraciones halladas en las grasas fueron bajas (27 y 30 µg/kg), y se encontraron lejos de los 200 µg/kg establecidos como referencia.

Se analizaron 94 muestras de pienso y sus materias primas. Se detectaron PCB en todas las muestras de pienso para acuicultura y de materias primas para piensos basadas en derivados de pescado (12% del total). La concentración de los PCB no similares a dioxinas en las muestras positivas estuvo en el intervalo 8-247 µg/kg. A su vez, la concentración de los PCB similares a dioxinas varió en el intervalo 18-107 µg/kg. La concentración del 55% de las muestras positivas superó los valores de referencia. La contaminación por PCB de los peces procedentes de acuicultura pudo deberse a los piensos utilizados en estas explotaciones.

Se analizó un total de 170 muestras de agua de las redes de abastecimiento de 125 localidades. La concentración media de trihalometanos en las muestras procedentes de la Ribera de Navarra (44 mg/L) fue casi cuatro veces superior a la encontrada en la Montaña (12 mg/L), y cerca de tres veces superior a la concentración promedio de la Zona Media (16 mg/L). La concentración del 99% de las muestras cumple la actual normativa sobre halometanos. Se observó una relación entre la materia en suspensión y la concentración de trihalometanos.

Se analizó un total de 135 muestras de agua, que procedían de redes de abastecimiento, sondeos y canales de 101 localidades de Navarra. Sólo se detectó un herbicida (cianazina) en una de las 135 muestras de agua analizadas, con una concentración (0,4 mg/L) que superaba el límite establecido. El agua en la que se detectó este herbicida procedía de un pozo del sur de Navarra, actualmente en desuso.

Puede extraerse la conclusión general de que los niveles de los contaminantes orgánicos estudiados en aguas y alimentos procedentes de Navarra, están, en general, muy por debajo de los límites establecidos. No se detectan riesgos de relevancia para la Salud Pública en lo referente a estos compuestos.

Mecanismos moleculares de regulación transcripcional del gen de la osteocalcina mediados por cambios en la comunicación celular

F. Lecanda

Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona.

FUNDAMENTO

La osteocalcina es la proteína, más específica, secretada por los osteoblastos, durante el proceso de formación ósea implicada en la modulación de la mineralización de la matriz. Su expresión está regulada por una variedad de señales entre las que se encuentran hormonas, factores de crecimiento, citokinas y las fuerzas mecánicas que se requieren para la homeostasis normal del hueso. Precisamente por la especificidad de esta proteína, su promotor ha sido intensamente estudiado con objeto de caracterizar los factores de transcripción tejido-específicos que son esenciales para la diferenciación osteogénica. A pesar de la cantidad de estudios realizados en este sentido, muchos elementos reguladores y factores de transcripción siguen siendo desconocidos. Particularmente, es interesante la región proximal del promotor (-0,2 kb) del promotor de osteocalcina que contiene varios elementos que dirigen tanto a nivel basal como inducido la expresión de osteocalcina, incluyendo, el elemento Runx2, un elemento de respuesta FGF, y un elemento de respuesta a cAMP.

Previamente hemos identificado una región rica en citosina y timidinas, dentro del promotor de osteocalcina que ensambla 2 complejos de actividad de unión proteína-DNA y regula la transcripción del gen. Hemos identificado uno de estos complejos conteniendo factores ubicuos sp1 (*specific protein 1*) y sp3 cuya unión está modulada por la comunicación por uniones-nexo.

Con objeto de definir el segundo complejo de unión proteína-DNA a este elemento rico en pirimidinas, realizamos una purificación de factores nucleares de osteoblastos e identificamos un factor llamado hnRNP K (ribonucleoproteína heterogénea K) como un regulador de la transcripción de la osteocalcina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se siguió el esquema de purificación señalado en la figura 1. Brevemente, se cultivaron las células ROS 17/2,8 de forma convencional en 40 frascos rodantes de 1 L. Posteriormente se tripsinizaron después de alcanzar la confluencia y se extrajeron los factores nucleares siguiendo el protocolo de Dignam. Posteriormente se realizaron una serie de etapas de purificación mediante cromatografías aniónica, catiónica utilizando como técnicas para seguir la actividad de unión al promotor, los geles de retardo y el South western blot. Combinando ambas técnicas obtuvimos un fracción con gran actividad de unión. Tras separar las proteínas mediante gel de poliacrilamida y realizar la secuenciación por espectrometría de masas obtuvimos un espectro compatible con la presencia de hnRNP K en el complejo.

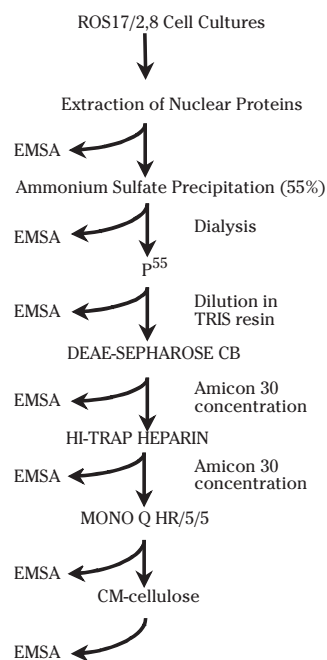


Figura 1. Esquema de las etapas de purificación.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

Se ha descubierto que esta proteína que tiene capacidad de translocarse del citosol al núcleo, constituye un nuevo represor del gen de la osteocalcina. La sobreexpresión de hnRNP K disminuye la expresión de mRNA alrededor de 5 veces. La utilización de promotores nativos y construidos heterólogos en construcciones con genes reporteros de luciferasa demostró que la sobreexpresión de hnRNP K reprime la actividad transcripcional en un elemento rico en CTs en la región proximal del promotor de osteocalcina. Geles de movilidad electroforética revelaron que la proteína recombinante hnRNP K se une a un elemento rico en CTs, pero en la conformación monocatenaria más que en las sondas doble hebra. Concordantemente un anticuerpo policlonal anti-hnRNP K es capaz de producir un superretraso de la actividad de unión en geles de movilidad electroforética utilizando sondas sense monocatenarias pero no con la hebra antisense o con oligonucleótidos doble hebra correspondiente al elemento rico en

CTs contenido en la región proximal del promotor -95 a -47 de osteocalcina.

Es más, la adición de hnRNP K recombinante a los extractos nucleares de células ROS 17/2,8 provoca una disrupción del complejo de formación proteína-DNA sobre el elemento doble hebra CT del promotor. Esta acción es mutuamente excluyente sobre la actividad observada en sondas monocatenarias en la capacidad de unión a DNA. Estos resultados demuestran que, aunque hnRNP K se purificó partiendo de una sonda doble hebra, no se une por sí misma a DNA doble hebra. Más

bien hnRNP K reprime la actividad transcripcional inhibiendo la formación de complejos de otros factores sobre el elemento CT del promotor de osteocalcina. Futuros estudios tratarán de identificar estos factores. Como conclusión, hemos identificado un nuevo factor de represión transcripcional del gen de osteocalcina, hnRNP K. Este factor multifuncional puede ser una diana para múltiples vías de señalización, una convergencia importante en la señalización celular y la transcripción génica.

Análisis proteómico y funcional de las alteraciones inducidas por las proteínas p210 y p190 dependientes del oncogén bcr-abl en la regulación del ciclo celular y su papel en el mecanismo de transformación

F. Prósper

Servicio de Hematología y Área de Terapia Celular. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

FUNDAMENTO

Una de las anomalías genéticas más estudiadas, asociada a enfermedades hematológicas, es la traslocación recíproca entre los cromosomas 9q34 y 22q11 conocida como cromosoma Filadelfia (Ph) que se presenta en más del 95% de los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) y en un 35% de los pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda (LLA). La t(9;22) genera un oncogén producido por la fusión del gen BCR (cromosoma 22) y el gen ABL (cromosoma 9), existiendo diferentes puntos de ruptura dentro del gen ABL que condicionan la aparición de diferentes transcritos de RNA mensajero. El oncogén BCR-ABL produce una proteína de fusión caracterizada por una actividad tirosina quinasa aumentada. De forma muy reciente se ha desarrollado un nuevo fármaco dirigido específicamente contra BCR-ABL denominado mesilato de imatinib (previamente conocido como STI571). La capacidad *in vitro* de inhibir específicamente la actividad quinasa dependiente de BCR-ABL ha hecho de este compuesto una herramienta fundamental en el estudio de los mecanismos de acción de BCR-ABL y han llevado a su utilización clínica con unos resultados muy prometedores. Sin embargo, ya se han detectado resistencias al STI571 en pacientes con LMC y LLA.

El fundamento de los estudios realizados ha sido:

- 1) Determinar las alteraciones inducidas por el oncogén BCR-ABL y que justifican las diferencias de comportamiento entre las células madre hematopoyéticas normales y las de pacientes con LMC.
- 2) Determinar mecanismos que participan en la fisiopatología de la LMC y en el desarrollo de resistencias al tratamiento con imatinib.

MATERIAL Y MÉTODOS

En nuestro trabajo hemos utilizado tanto líneas celulares derivadas de pacientes con LMC y LLA con la alteración cromosómica BCR-ABL como muestras de pacientes con LMC en distintas fases de la enfermedad.

En un análisis inicial, hemos realizado estudios de expresión génica mediante arrays de expresión, comparando células madre hematopoyéticas de LMC (células CD34) con células madre hematopoyéticas de controles sanos. Asimismo hemos valorado el efecto que sobre el patrón de expresión génica tiene el tratamiento *in vitro* con imatinib.

Hemos realizado un análisis similar mediante técnicas de proteómica, utilizando geles bidimensionales y análisis mediante espectrometría de masas, pero en este caso hemos empleado mayoritariamente líneas celulares.

Para determinar los mecanismos que regulan el ciclo celular y la apoptosis en células de LMC una vez identificadas nuestras dianas moleculares mediante citometría de flujo y ensayos de proliferación y apoptosis, hemos empleado técnicas *Western Blot*, inmunoprecipitación y ensayos quinasa, así como estudios de transfección mediante vectores virales que nos han permitido introducir diferentes construcciones en las células utilizadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios mediante arrays de expresión y proteómica.

Hemos observado que 1.124 genes se expresan de forma diferente entre las células CD34 de pacientes con LMC y las células CD34 de sujetos normales, genes implicados en ciclo celular, apoptosis, adhesión, repa-

ración del ADN, trasducción de señal, factores transcripcionales o genes de metabolismo. Muchos de estos genes han sido previamente implicados previamente en la fisiopatología de la LMC, mientras que otros sugieren nuevas rutas de trasducción de señal potencialmente empleadas en LMC. Un ejemplo es el caso de la regulación positiva de SKP2.

El tratamiento con imatinib durante 12 ó 24 horas produce la regulación de 772 y 730 genes nuevamente implicados en la mayoría de las rutas que controlan la célula. Es interesante que tras 24 horas de tratamiento con imatinib el perfil de expresión génica de las células de LMC se agrupa con las células CD34 normales mediante la utilización de dendrogramas. Curiosamente, del conjunto de genes regulados tras el tratamiento con imatinib, tan solo 179 y 154 genes a las 12 y 24 horas respectivamente dependen de la acción de BCR/ABL y 24 y 25 son independientes de la actividad quinasa de BCR/ABL. Estos genes son particularmente atractivos, ya que al no depender de la actividad quinasa de c-abl, son genes potencialmente implicados en la resistencia de la enfermedad al tratamiento con imatinib.

Los estudios de líneas BCR/ABL mediante geles bidimensionales y espectrometría de masas, nos han llevado de forma análoga a los estudios anteriores a identificar nuevas proteínas disreguladas en células de LMC, como por ejemplo de la familia de las *Heat Shock Proteins* (HSP) que se encuentran sobreexpresadas en las células de LMC.

Mecanismos de regulación del ciclo celular en LMC.

La presencia del oncogén BCR/ABL se asocia con un aumento de la proliferación celular. En la segunda

parte del trabajo hemos podido demostrar que el tratamiento con imatinib induce una parada del ciclo celular en fase G1, dependiente de la ruta de PI3K/AKT. Se produce una acumulación nuclear de la proteína p27^{kip2} y una regulación negativa de las ciclinas D y E. Hemos podido demostrar mediante estudios de PCR en tiempo real así como estudios de pulso y caza que BCR/ABL regula la expresión de p27^{kip2} a nivel transcripcional, pero a su vez es capaz de regular los niveles de p27^{kip2}, induciendo su degradación a nivel proteasomal. Esta degradación por el proteasoma depende de la regulación positiva a nivel transcripcional de SKP2. Finalmente, hemos observado que la regulación de p27^{kip2} no es un epifenómeno en la patogénia de la LMC sino que juega un papel relevante ya que la trasfección de células de LMC con un mutante de p27^{kip2} no sensible a la degradación por el proteasoma produce una inhibición del ciclo celular en células de LMC. En definitiva, estos estudios apoyan la participación del proteasoma en la patogénia de la LMC y justifican la utilización de nuevos fármacos con actividad inhibitoria sobre el proteasoma.

Asimismo hemos estudiado las diferencias entre las células p190 y p210 y hemos observado que PTEN está regulado de forma diferente en ambos modelos celulares y también en células primarias. Mientras que las células de LMC entran en apoptosis tras el tratamiento con imatinib, las células de LLA inhiben el ciclo celular pero no entran en apoptosis. Además, la expresión de PTEN en células LLA está regulado negativamente debido a la metilación de su promotor. Esta regulación negativa justifica que no sea capaz de inactivar la vía PI3K/AKT fundamental para la supervivencia celular y que justificaría las diferencias de comportamiento entre las células de LMC y LLA.

Susceptibilidad o resistencia al desarrollo de obesidad inducida por la grasa de la dieta en humanos: identificación de genes del tejido adiposo implicados mediante tecnología microarray

M.J. Moreno

Departamento de Dietética y Nutrición. Universidad de Navarra. Pamplona.

FUNDAMENTO

La obesidad es un serio problema de salud pública que ha alcanzado proporciones epidémicas en muchos países desarrollados. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la carga genética (el genotipo) de cada individuo determina su susceptibilidad a obesidad, aunque el desarrollo de la misma (su expresión fenotípica) está determinada por el ambiente, es decir por su estilo de vida. Es bien conocido que una parte de la población es más sensible al desarrollo de obesidad inducida por un alto consumo de grasa, mientras que otros individuos con hábitos nutricionales seme-

jantes son resistentes a la ganancia de peso. Constituye, por tanto, un reto averiguar por qué con ingestas calóricas de composición nutritiva similar y actividad física semejante, unas personas desarrollan obesidad y otras no.

Se han identificado más de 430 genes, marcadores y regiones cromosómicas asociadas o ligadas a la obesidad. Debido a que en la mayor parte de los casos la obesidad es de origen poligénico, los biochips de ADN, que permiten examinar miles de genes en una sola hibridación, constituyen una herramienta muy poderosa para identificar y comparar cambios de expresión

génica que pudieran subyacer a la resistencia o susceptibilidad a obesidad. El tejido adiposo es un importante órgano secretor, con un papel clave en la regulación del peso corporal. Por ello, el objetivo del presente estudio fue identificar alteraciones en la expresión de genes del tejido adiposo relacionadas con la predisposición al desarrollo de obesidad inducida por la dieta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los voluntarios fueron reclutados mediante cuestionario de frecuencia de consumo alimentario, actividad física y estado de salud que nos permitieron identificar individuos delgados y obesos con alta ingesta de grasa y hábitos de vida semejantes. Las características de la ingesta habitual de ambos grupos de individuos se volvieron a evaluar mediante un cuestionario de registro de pesada de alimentos durante 3 días. Tras la determinación del peso e índices antropométricos, se analizó la composición corporal mediante bioimpedancia. Se realizaron extracciones sanguíneas para la determinación de hormonas (radioinmunoensayo) y metabolitos (autoanalizador Cobas). La realización de calorimetrías indirectas (*Deltatrac II Datex*, Finlandia) en ayunas y durante 3 horas después de tomar un desayuno rico en grasa nos permitió evaluar la tasa metabólica basal, el coeficiente respiratorio no proteico, el efecto termogénico y la utilización de los sustratos metabólicos. Tras la obtención de biopsias de tejido adiposo abdominal subcutáneo, se extrajo el ARN total y los cambios en la expresión génica se analizaron con el microarray GeneChip[®] Human U133A y B de Affymetrix. Los cambios en la expresión de genes se verificaron mediante PCR a tiempo real (ABI Prism 7000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han identificado dos grupos de individuos con diferente susceptibilidad al desarrollo de obesidad inducida por la dieta. De hecho, a pesar de presentar

ingestas calóricas similares y con un contenido elevado en grasas, además de una actividad física comparable, un grupo de individuos fue capaz de mantener un peso corporal normal, mostrando su resistencia al desarrollo de obesidad. Se observaron unos valores similares de metabolismo basal y de oxidación de grasas (ajustados por masa magra y grasa) en individuos susceptibles y resistentes. Sin embargo, el estudio del comportamiento postprandial tras administrar una comida rica en grasas, sugiere una menor capacidad en la respuesta oxidativa a la ingesta de grasa en los individuos obesos, que pudiera estar relacionada con su susceptibilidad a desarrollar obesidad.

Los individuos resistentes a obesidad presentaron unos niveles basales más elevados de adiponectina. Además, es de destacar un incremento significativo en los niveles de adiponectina tras la ingesta en los individuos resistentes pero no en los susceptibles. Por otra parte, la disminución en la sensibilidad a la insulina observada en los pacientes susceptibles al desarrollo de obesidad podría derivar, al menos en parte, de los bajos niveles de adiponectina que presentan estos sujetos.

El estudio de la expresión génica en tejido adiposo mediante tecnología microarray reveló diferencias importantes en el perfil de expresión entre individuos susceptibles y resistentes, identificándose 85 secuencias reprimidas y 33 sobreexpresadas en sujetos susceptibles frente a resistentes al desarrollo de obesidad. Es de destacar la elevación de genes relacionados con el estado proinflamatorio en sujetos susceptibles, ya que estudios recientes han sugerido una asociación entre el desarrollo de obesidad y un estado inflamatorio probablemente iniciado en el tejido adiposo. Entre los genes reprimidos en sujetos obesos, se encuentran los correspondientes a varias enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos, sugiriendo su implicación en los procesos que confieren susceptibilidad al desarrollo de obesidad.