

## Identificación de los principales factores de riesgo de accidentes de tráfico mediante un diseño de cohortes prospectivas

M. Seguí-Gómez, M.A. Martínez, J. de Irala, F. Guillén, I. Aguinaga, A. Alonso, A. Sánchez, C. Rubio

Departamento de Medicina Preventiva. Universidad de Navarra. Pamplona.

**Fundamento.** Los casi 7 millones de accidentes de tráfico que ocurren en España cada año constituyen un grave problema de salud pública. Con casi 6.000 muertes anuales, los accidentes de tráfico representan entre la primera y cuarta causa de muerte de la población, según edad. Y los 32.000 lesionados anuales que requieren ingreso hospitalario constituyen una de las causas más comunes de hospitalización. Pese a las proporciones epidémicas de este problema, el estudio epidemiológico analítico de los accidentes de tráfico es escaso, siendo los estudios descriptivos basados en datos policiales los más habituales.

Con este estudio proponemos caracterizar y cuantificar los factores de riesgo relacionados con la incidencia y gravedad de los accidentes de tráfico y los traumatismos resultantes de los mismos mediante el uso de los métodos propios de un estudio prospectivo de cohortes epidemiológicas. En concreto, proponíamos utilizar una fuente de información excepcional, el estudio Seguimiento Universidad de Navarra, un estudio prospectivo de cohortes multipropósito iniciado a finales de 1999. Algunas de las hipótesis específicas a ser evaluadas incluían la mayor incidencia de lesiones por accidente de tráfico entre aquellos que refieren viajar más kilómetros anuales en coche o motocicleta; aquellos que refieren no usar nunca o casi nunca el cinturón de seguridad; aquellos conductores que reporten beber más alcohol; y aquellos que reporten tener problemas al dormir (por ejemplo, apnea de sueño o uso de ciertas medicaciones). Además, proponemos investigar el uso de cinturón de seguridad entre aquellos individuos que se supone que son más conscientes y responsables de su propia salud por tener estilos de vida considerados "sanos" (por ejemplo dieta sana, no fumar y hacer ejercicio).

Además, proponíamos investigar la reproducibilidad de las variables relacionadas con la ocurrencia de lesiones por accidente de tráfico que requieren hospitalización de 24 horas o más, lesiones que no requieren hospitalización y el kilometraje medio anual viajado.

**Material y métodos.** Para poder alcanzar nuestros objetivos tuvimos que desarrollar, enviar y procesar las respuestas del primer cuestionario de seguimiento (es decir, el que los participantes deben cumplimentar a los dos años de haber ingresado en el estudio). Este cuestionario incluye información sobre diferentes características que pudieran ser importantes factores de riesgo o factores protectores en la incidencia de los accidentes de tráfico, tales como el papel de los principales patrones de exposición, los comportamientos

de riesgo, las creencias, actitudes y grado de responsabilidad de cada individuo hacia su propia salud.

Respecto al objetivo secundario de evaluar la calidad de determinadas variables de este primer cuestionario de seguimiento realizamos, en el verano de 2003, un estudio con una muestra de los primeros cuestionarios de seguimiento recibidos. Entre estos, escogimos todos los 12 sujetos que decían haber sufrido una hospitalización por accidente de tráfico, y una muestra del 10% de aquellos que decían no haber sufrido dicha circunstancia. Desarrollamos una entrevista telefónica de unos 15 minutos de duración. Tres entrevistadoras entrenadas a tal efecto trataron de localizar y enlazar en este estudio de calidad a un total de 528 participantes del Seguimiento Universidad de Navarra.

**Resultados.** A 31 de diciembre de 2003, este primer cuestionario de seguimiento se ha enviado a 10.098 participantes, de los cuales 8.280 (82%) habían respondido a esta misma fecha, bien sea tras el primer envío o tras cualquiera de los hasta 5 envíos recordatorios que realizamos para garantizar una tasa de respuesta elevada. De éstos, 5.938 (72%) estuvieron revisados y listos para análisis estadístico en esta fecha, pero a fin de poder tener mayor potencia estadística, decidimos esperar a finales de febrero de 2004, cuando esperamos tener listos para análisis todos los 8.280 cuestionarios recibidos. Es entonces cuando investigaremos las hipótesis inicialmente propuestas.

Respecto a la evaluación de la calidad de los datos, destacar que un 90% de los 528 sujetos accedieron a participar en la entrevista telefónica. Ésta nos permitió confirmar que el índice de correlación para el kilometraje medio anual era de 0,69 ( $p < 0,001$ ) o bueno según los criterios de la literatura internacional. Respecto a la reproducibilidad de lesiones por accidente de tráfico que no requirieran hospitalización, el índice de concordancia de kappa fue de 0,64 (IC 95% 0,57-0,71); mientras que el índice de concordancia de kappa respecto al haber necesitado una hospitalización tras un AT fue de 0,66 (IC 95% 0,41-0,91).

**Conclusión.** La evaluación de las hipótesis principales del estudio está todavía pendiente, aunque preveamos realizarla en breve. La evaluación de la calidad de los datos del cuestionario escrito revela unos índices de concordancia razonables para estudios epidemiológicos como el aquí propuesto. Pese a ello, estamos investigando en más detalle las posibles causas de las discrepancias, principalmente las relacionadas con la ocurrencia de una hospitalización en relación con un accidente de tráfico.

## Estudio de casos y controles sobre la relación de diversas mutaciones genéticas (receptores B3-adrenérgicos y PPAR $\gamma$ 2) y el estilo de vida (dieta-actividad física) con el riesgo de sobrepeso-obesidad en niños

A. Martí

Departamento de Dietética y Nutrición Humana. Universidad de Navarra.

**Fundamento.** El peso corporal está determinado por una interacción entre factores genéticos y ambientales relacionados con el estilo de vida. Una alteración en alguno o varios de estos factores origina un desajuste que puede provocar un balance energético positivo y la consecuente aparición de obesidad. Debido al aumento tan acusado de la obesidad que se está produciendo en la sociedad actual, muchas investigaciones están encaminadas a esclarecer la causa de la misma, que incluye factores genéticos y neuroendocrinos además de los relacionados con el estilo de vida (dieta y actividad física).

En España entre los años 1985 y 1995 se realizó un estudio en Aragón. La prevalencia de obesidad -IMC>P95, según valores de referencia de la *National Health and Nutrition Examination Survey* (USA)- es de 1,5% en niñas y 6,0% en niños de 6-7 años y en adolescentes de 13-14 años; 14,2% en varones y 17,7% en mujeres. Recientemente se ha realizado un estudio epidemiológico de obesidad infantil y juvenil: Estudio ENKID con diferentes criterios para definir la obesidad, entre ellos, utilizaron como valores de referencia las tablas de Hernández y col (1998), que utilizan la mayoría de los pediatras españoles y están basadas en una población del norte de España. Consideran el punto de corte para sobrepeso en el percentil 85 y para la obesidad en el percentil 97.

**Material y métodos.** Nuestro primer objetivo fue el reclutamiento de una muestra de 185 niños/as y adolescentes obesos de 6-18 años y 185 controles emparejados por sexo y edad, residentes en Navarra. Los casos han sido identificados en los servicios de

Pediatría de la Clínica Universitaria, de Endocrinología pediátrica del Hospital Virgen del Camino y del Centro de Salud de Barañain. Los controles fueron seleccionados de entre los niños y adolescentes que acuden a revisiones médicas periódicas a los siguientes centros: Servicio de Pediatría de la Clínica Universitaria, Centro de Salud de Barañain, Centro de Salud de Sangüesa y Centro de Salud de Santesteban.

En la población seleccionada se han estudiado los parámetros bioquímicos y antropométricos y se ha caracterizado el estilo de vida de los sujetos en cuanto a dieta y actividad física. Además, se ha estimado la prevalencia de los polimorfismos Trp64Arg del receptor adrenérgico beta-3 y Pro12Ala del gen PPAR $\gamma$ , estos receptores parecen jugar un papel en el desarrollo de la obesidad.

Este método consiste en la identificación de variantes en genes con una función relevante en la regulación del peso corporal: "genes candidatos". Se buscan mutaciones en la secuencia del gen por medio de una amplificación de regiones conocidas por PCR y posterior digestión de los fragmentos de ADN con enzimas de restricción específicos, que cortan los fragmentos de forma diferenciada según porten el polimorfismo o no.

**Resultados y Discusión.** Los sujetos reclutados forman una muestra de casos y controles con características antropométricas, bioquímicas y de estilo de vida (dieta/actividad física) bien definidas y diferenciadas lo que garantiza el éxito de los futuros estudios. Los genes del receptor adrenérgico  $\beta$ 3 y el receptor activado por el proliferador del peroxisoma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )

**Tabla 1.** Datos antropométricos de la muestra estudiada.

	OBESOS (n=185)		CONTROLES (n=185)		P
	Media	SEM	Media	SEM	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27,64	0,34	18,91	0,20	<0,001
Peso (Kg)	64,32	1,50	42,95	1,00	<0,001
Talla (m)	1,50	0,01	1,48	0,01	0,223
% Grasa	35,22	0,56	18,14	0,63	<0,001
Perímetro de cintura (cm)	86,80	1,24	65,99	0,59	<0,001
Perímetro de cadera (cm)	99,90	1,27	81,72	0,88	<0,001
Perímetro braquial (cm)	30,40	0,29	22,48	0,24	<0,001
Pliegue tricipital (mm)	25,04	0,44	15,72	0,46	<0,001
Pliegue subescapular (mm)	25,54	0,58	11,23	0,57	<0,001
CST*	1,03	0,02	0,75	0,04	<0,001

SEM=Error típico. \*Cociente pliegue subescapular/pliegue tricipital.

**Tabla 2.** Datos bioquímicos y endocrinos de la muestra estudiada.

	OBESOS (n=185)		CONTROLES (n=185)		P
	Media	SEM	Media	SEM	
Glucosa (mg/dL)	89,00	0,59	84,00	0,72	<0,001
Colesterol (mg/dL)	163,29	2,10	164,69	2,48	0,666
HDL (mg/dL)	50,17	1,03	59,77	1,07	<0,001
LDL (mg/dL)	100,12	1,80	91,69	2,43	0,005
Triglicéridos (mg/dL)	83,24	3,60	63,92	2,85	<0,001
Colesterol/HDL	3,43	0,07	2,83	0,01	<0,001
Leptina (mg/L)	36,55	1,56	11,67	1,06	<0,001
Insulina (mU/mL)	17,60	0,81	9,30	0,65	<0,001
HOMA	3,92	0,19	1,99	0,16	<0,001
QUICKI	0,323	0,00	0,371	0,00	<0,001

**Tabla 3.** Prevalencia de la mutación Trp64Arg y Pro12Ala en la muestra estudiada.

	Casos (n=182)	Controles (n=165)
Frecuencia alélica de Arg64	0,07	0,08
Prevalencia %		
Trp64Trp	86,8	83,0
Trp64Arg	13,2	17,0

	Casos (n=184)	Controles (n=174)
Frecuencia alélica de Arg64	0,13	0,08
Prevalencia %		
Pro12Pro	75,7	78,9
Pro12Ala	22,2	15,1
Ala12Ala	1,6	0,0

son genes candidatos estudiados en diversas poblaciones por su relación con la obesidad. La sustitución de un triptófano por una arginina en el codón 64 (Trp64Arg) es el polimorfismo más relevante del receptor adrenérgico  $\beta_3$  y está localizado en el primer dominio transmembrana. Existen diversos estudios que han encontrado asociación entre este polimorfismo y la obesidad, el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina, aunque otros trabajos no han encontrado ninguna asociación con el alelo Arg64.

El polimorfismo más frecuente del gen PPAR<sub>γ</sub> se traduce en un cambio de una prolina por una alanina en el aminoácido 12 de la proteína. Este polimorfismo aparece con una frecuencia alélica aproximada de 0,14 en caucásicos y de 0,02 en mongoles y afro-americanos. Beamer y col (1998) realizaron un estudio con dos

subpoblaciones de norteamericanos (caucásicos), una de ellas de sujetos de peso normal y obesidad moderada y otra de individuos con obesidad severa. En ambos grupos se observó que los portadores de alanina presentaban un mayor índice de masa corporal (IMC) que los no portadores.

En nuestra población la prevalencia del polimorfismo Trp64Arg del gen del receptor adrenérgico beta-3 es del 7% en los casos y 8% en los obesos, siendo estos porcentajes algo menores a los descritos en otros estudios. Sin embargo, la prevalencia del polimorfismo Pro12Ala del gen del receptor PPAR gamma es del 13% en los casos y 8% en controles. Estos porcentajes son similares a los descritos en otros estudios realizados en poblaciones europeas.

## Valoración de la patología lumbar crónica mediante tomografía axial computarizada con simulación de la bipedestación

S. García Asensio, L. Sarría, H. Gómez, M.T. Martínez-Berganza, F. Lameiro, R. Cozcolluela, N. Zabalza

Servicio de Radiología. Hospital de Tudela. Navarra.

Servicio de Medicina Preventiva y Traumatología. Hospital de Tudela. Navarra.

**Fundamento.** El propósito de este estudio es demostrar los cambios cuantitativos que sufre la columna lumbar durante la realización de la TC lumbar con simulación de bipedestación y relacionar éstos con los síntomas de los pacientes.

**Material y métodos.** Se han estudiado mediante TC lumbar dinámica 52 pacientes (27 mujeres y 25 hombres con una media de edad de 40 a 49 años). Los criterios de inclusión han sido:

1. Pacientes con dolor lumbar crónico.
2. TC lumbar previo normal o inespecífico.
3. Aceptación por parte del paciente de la realización de la prueba.

Se ha realizado una TC lumbar con un escáner ProSpeed SX de GE. Primero la columna (los tres últimos niveles lumbares) se estudia en condiciones de psoas relajado y después con simulación de bipedestación realizando una compresión de la columna (Fig. 1). Se realiza una valoración cuantitativa del canal espinal en la estación de trabajo para comparar los resultados entre ambas condiciones. Los resultados se expresan como media  $\pm$  IC. El estudio dinámico se considera positivo cuando el resultado del mismo explicaba la clínica del paciente y negativo cuando no existían datos de imagen que justificaran la clínica.



**Figura 1.** Paciente con el aparato de tracción para la realización del TAC con simulación de la bipedestación. Las piernas permanecen estiradas mientras el aparato de tracción ejerce desde los hombros una tracción equivalente al peso que soporta la columna durante la bipedestación (la mitad del peso corporal).

**Resultados.** La duración media de los síntomas ha sido de 27,05 meses (rango 2-120). Los síntomas más frecuentes han sido la lumbociática derecha (41,17% de los pacientes), la lumbociática izquierda (25,49%) y la clínica sugestiva de estenosis de canal (25,49%). En 40 (76,9%) pacientes, la TC dinámica ha aportado datos adicionales a la TC lumbar convencional.

El valor del área del canal espinal está comprendido entre 23-316 mm<sup>2</sup>. La reducción media del área del canal entre las series realizadas en posición de psoas relajado y con simulación de bipedestación ha sido de 6,22 IC (2,20-10,23) mm<sup>2</sup> en el nivel L3-L4, de 10,21 IC (4,59-15,83) mm<sup>2</sup> en L4-L5 y de 2,45 IC (-5,58-10,48) mm<sup>2</sup> en L5-S1 (Tabla 1). Los cambios en el área del disco son más evidentes en el nivel L5-S1.

El TC dinámico ha demostrado: estenosis absoluta en 19 niveles y relativa en 26, protusión discal generalizada en 19 casos y en 15 pacientes hernia discal. En 11 casos se ha diagnosticado una estenosis relativa en el estudio realizado en posición de psoas relajado que sin embargo, en el estudio con tracción, ha pasado a ser una estenosis crítica; en 4 casos de diámetro AP del canal ha sido normal en el estudio realizado en posición de psoas relajado, existiendo una estenosis crítica en el estudio realizado con tracción; y en 11 el diámetro AP del canal ha pasado de ser normal en el estudio en posición de psoas relajado a mostrar una estenosis subcrítica en el realizado con tracción lumbar.

La media de la diferencia de la distancia interpedicular entre los estudios realizados con TL y en posición de PR ha sido de -0,3039 IC (-0,7052 - 0,0973) mm en el nivel L3-L4, de -0,8327 IC (-1,3770 - 0,2884) mm en L4-L5, y de 0,0216 IC (-0,6153 - 0,6584) mm en L5-S1; sin embargo, las diferencias sólo han sido significativas estadísticamente en el nivel L4-L5.

La anchura del ligamento amarillo y la altura del foramen no han mostrado diferencias significativas entre ambas posiciones.

**Conclusión.** El TAC lumbar dinámico muestra hallazgos no visualizados mediante el TAC convencional. En pacientes con patología lumbar en los que la TC convencional no demuestre ningún hallazgo que justifique la clínica o no sea concluyente, debe de realizarse estudio dinámico mediante simulación de la bipedestación para una correcta valoración del área del canal y del foramen.

**Tabla 1.** La diferencia entre los valores del área del canal medidos en posición de psoas relajado y con simulación de la bipedestación son significativos si son mayores de 15 mm<sup>2</sup>. A continuación se detallan los pacientes en los que se ha encontrado esta diferencia significativa y la presencia de síntomas o no al aplicar la compresión lumbar para simular las condiciones de bipedestación. Obsérvese que el total de pacientes en los que se ha estudiado los niveles L3-L4 y L5-S1 es 51 y no 52, debido un error técnico en el rango del estudio en dos pacientes (Schömström y col).

NIVEL	Número de personas que presentan...				Validez de la prueba				TOTAL
	Prueba positiva* y manifiestan clínica a la tracción	Prueba positiva* y No manifiestan clínica a la tracción	Prueba negativa* y manifiestan clínica a la tracción	Prueba negativa* y No manifiestan clínica a la tracción	Sensibilidad	Especialidad	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo	
L3-L4	5	4	23	19	18%	83%	56%	45%	51
L4-L5	11	8	18	15	38%	65%	58%	45%	52
L5-S1	9	9	19	14	32%	61%	50%	42%	51

## Contribución al diagnóstico citogenético y molecular de neoplasias mieloides. Análisis mediante FISH de las regiones cromosómicas 12p13 y 16p13 y clonaje y caracterización de nuevos genes implicados en reordenaciones con TEL/ETV6 y CBP

**M.D. Otero**

Departamento de Genética. Universidad de Navarra. Pamplona.

**Fundamento.** El proceso neoplásico se caracteriza por la adquisición de cambios genéticos somáticos que con frecuencia se asocian con rasgos morfológicos y clínicos. La detección de translocaciones y otras alteraciones estructurales no aleatorias que tienen lugar en las enfermedades neoplásicas hematológicas ha ayudado a diseñar clasificaciones más exactas, identificando grupos con distinta etiología y distinto pronóstico y, en combinación con los estudios moleculares, han proporcionado importantes conocimientos sobre la patogénesis de estas enfermedades.

Las reordenaciones del brazo corto del cromosoma 12 (translocaciones, deleciones o inversiones) son alteraciones frecuentes en neoplasias hematológicas, tanto mieloides como linfoides. La mayoría de estas alteraciones afectan a una pequeña región en 12p13 que contiene los genes ETV6 (TEL) y KIP1. El gen ETV6 se encuentra reordenado en más del 50% de las translocaciones 12p13. Este gen es el primer factor de transcripción identificado que se requiere específicamente para el establecimiento de la hematopoyesis en la médula ósea, y está implicado en el mayor número de translocaciones descrito hasta ahora: se han identificado 40 mediante hibridación "in situ" con fluorescencia (FISH) y de éstas, se han clonado 12 de los genes implicados. Los puntos de rotura se distribuyen a lo largo del gen y ETV6 contribuye a la transformación

leucémica por diversos mecanismos. La caracterización molecular de estos productos de fusión ha llevado a la clonación de nuevos genes y ha proporcionado una información clínica de enorme utilidad.

Por otra parte, la importancia del gen CBP y su localización en la banda 16p13, cerca del telómero, sugiere la posibilidad de que este gen esté implicado con frecuencia en reordenaciones cromosómicas, aunque no se puedan detectar mediante las técnicas citogenéticas convencionales, del mismo modo que pasó con ETV6.

El objetivo del proyecto fue analizar mediante FISH las regiones cromosómicas 12p13 y 16p13, y clonar y caracterizar nuevos genes implicados en reordenaciones con ETV6 y CBP. En memorias anteriores propusimos incluir en el estudio el análisis de pacientes con reordenaciones en 1p36 y 11p15.

**Material y métodos.** Se ha realizado:

- Hibridación "in situ" con fluorescencia (FISH).
- Extracción de ácidos nucleicos y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- RT-PCR semicuantitativa.
- Amplificación rápida de extremos de cDNA: RACE-PCR.
- Clonaje y secuenciación de DNA.

**Resultados y Discusión.** El estudio de la t(1;12)(p36;p13) en un paciente con síndrome mielodisplásico ha permitido la caracterización de un nuevo gen fusionado a ETV6. Este gen, al que hemos denominado *Myelodysplasia Syndrome 2* (MDS2), se ha caracterizado a nivel estructural, y se ha estudiado su patrón de expresión en 16 tejidos.

El estudio de una muestra de médula ósea del paciente que presentó la inv(12;12)(p13;q24), ha permitido detectar un producto de PCR específico que se ha clonado. Esperamos poder terminar la identificación del nuevo gen en 12q24 implicado en la translocación con ETV6 en los próximos meses. Por otra parte, se han diseñado 8 sondas de FISH para estudiar la región cromosómica 12p13, y se han analizado 15 nuevos pacientes con reordenaciones 12p13. Ninguno ha presentado nuevas translocaciones en las que estuviera implicado el gen ETV6.

Se han diseñado 4 sondas de FISH para estudiar la región cromosómica 16p13, y se han analizado 11 pacientes con reordenaciones en esa banda. Sólo uno de ellos presentó reordenación del gen CBP. El estudio molecular de ese caso permitió caracterizar la translocación t(10;16)(q22;p13), y confirmar que los genes implicados eran CBP y MORF. Esta translocación sólo se había descrito una vez en la bibliografía.

El estudio de la región cromosómica 1p36 ha permitido la identificación de casos interesantes desde el punto de vista genético, y de nuevas translocaciones recíprocas. Se ha demostrado que hay heterogeneidad en los pacientes con t(1;3)(p36;q21) y que la expresión ectópica de MEL1 (1p36) no es el mecanismo molecular implicado, al contrario de lo sugerido previamente.

Por otra parte, el análisis de 26 pacientes con alteraciones 1p36 ha permitido delimitar una región de 2,5 Mb donde se agrupan 78% de los puntos de rotura. Hemos estudiado esta región mediante técnicas bioinformáticas y hemos detectado una elevada frecuencia de ciertas repeticiones genómicas que pueden explicar la tendencia a la agrupación.

El estudio mediante técnicas de citogenética molecular de la región 11p15 mediante sondas que flanqueaban el gen NUP98 ha permitido el análisis de 22 pacientes con alteraciones en esa región. Sólo hemos encontrado 2 casos en los que NUP98 estuviera reordenado. En un caso con una t(10;11)(q25;p15) caracterizamos un nuevo gen en 10q25 implicado en la translocación con NUP98, el gen ADD3. El otro caso presentó una reordenación compleja en la que NUP98 estaba reordenado con el gen HOXA9.

## Estudio molecular e inmunohistoquímico de la delección del gen PTEN en los astrocitomas de alto y bajo grado y su relación con la proliferación tumoral y angiogénesis. Significado pronóstico

**M.A. Idoate Gastearena**

Departamento de Anatomía Patológica. Clínica Universitaria de Navarra.

### FUNDAMENTO

El gen PTEN/MMAC (10q23) es un gen supresor relevante implicado en la progresión y el control de la angiogénesis de los astrocitomas. El producto de este gen es una fosfatasa citoplasmática que controla el factor del crecimiento del endotelio de los vasos (VEGF), que es una de las moléculas más importantes implicadas en la proliferación vascular. Existen escasas publicaciones sobre el efecto de las alteraciones del gen PTEN sobre el factor VEGF y la actividad proliferativa tumoral, así como el significado pronóstico de estas alteraciones moleculares en los astrocitomas de alto y bajo grado.

### MATERIAL Y MÉTODOS

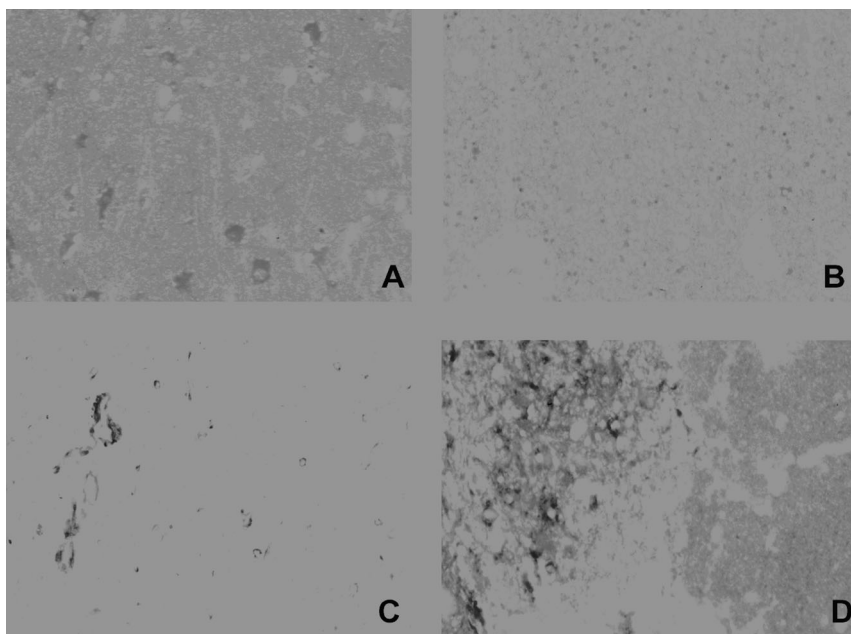
Se estudiaron 133 astrocitomas cerebrales reseca- dos quirúrgicamente (24 de grado II, 27 de grado III y 82 de grado IV). Se llevó a cabo estudio combinado que incluyó detección de pérdida de heterocigosidad (LOH) de la región del gen PTEN mediante 4 marcadores de microsátelites; técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) mediante sonda pericentro-

mérica para evaluar las alteraciones del cromosoma 10; determinación del RNAm del gen PTEN mediante técnica de RT-PCR a tiempo real de 25 muestras congeladas de astrocitoma (5 de grado II, 8 de grado III y 12 de grado IV, de tejido cerebral humano y de una línea celular de glioblastoma con mutación para el gen PTEN; estudio inmunohistoquímico de las proteínas PTEN y VEGF; determinación de la actividad proliferativa mediante marcaje del antígeno Ki-67 y citofluorométricamente (fase S e índice de proliferación). También se recogieron los datos clínicos más relevantes y seguimiento total de los pacientes. Se aplicó test del Chi-cuadrado para el análisis de los datos cualitativos y U de Mann-Whitney, test de Kruskal-Wallis para las variables cualitativas, y análisis de Kaplan-Meier y Cox para los datos de supervivencia, mediante el soporte informático SPSS 9.0. Sólo los valores de p inferiores a 0,05 fueron considerados como significativos.

### RESULTADOS

Se observó pérdida de heterocigosidad (LOH) del gen PTEN en el 84% de los astrocitomas de grado IV, en





**Figura 1.** (A) Expresión de la proteína PTEN en cerebro normal. Apréciase la intensa inmunopositividad neuronal. En cambio, los vasos sanguíneos no muestran inmunorreacción (x200). (B) Inmunopositividad homogénea de un astrocitoma grado II frente a PTEN (x200). (C) Inmunonegatividad frente a PTEN en un astrocitoma de grado IV. Sin embargo, los vasos sanguíneos acompañantes del tumor muestran expresión de la proteína (x200). (D) Un astrocitoma de grado IV que muestra una expresión mayor de la proteína PTEN que en la corteza cerebral incluida en la biopsia (x200).

el 77% de los de grado III y en el 10% de los astrocitomas fibrilares de grado II, 3 gemistocíticos y 2 fibrilares. En los astrocitomas de alto grado se apreció que la delección era más marcada en los astrocitomas de grado IV que en los de grado III ( $\geq 2$  loci delecionados, 6 y 24% respectivamente). Se apreció monosomía del cromosoma 10 en los astrocitomas de alto grado (6% de grado III y 43% de grado IV), y en 11% de los tumores de grado II, que correspondían a un tumor gemistocítico y a uno fibrilar. Se apreció expresión citoplasmática de la proteína pPTEN en el tejido cerebral normal y en astrocitomas de grado II. En los de alto grado existía frecuentemente pérdida de expresión en 62% y 30% de los de grado IV y III respectivamente, que frecuentemente seguía un patrón heterogéneo. La inmunonegatividad frente a PTEN se asoció con delección del gen PTEN ( $\geq 2$  loci delecionados) ( $P=0,04$ ), pero no con monosomía del cromosoma 10. La expresión de VEGF fue citoplasmática frente a VEGF en las células tumorales en los astrocitomas de alto grado, pero no en los de bajo grado ni en el tejido cerebral. La inmunoexpresión de PTEN se asoció con inmunonegatividad frente a VEGF en los astrocitomas de grado II, pero no en los astrocitomas de alto grado, cuando se compararon las mismas áreas ( $P=0,27$ ). No se ha observado correlación entre la actividad proliferativa valorada mediante Ki-67 o citofluorometría y la expresión de la proteína PTEN ( $P=0,17$ ), pero sí con la delección del gen PTEN ( $P=0,004$ ). La expresión de RNAm del gen PTEN en los

tumores de grado II ( $1,00\pm 0,001$ ) fue significativamente mayor que en los de grado III ( $0,33\pm 0,16$ ) o grado IV ( $0,45\pm 0,12$ ) ( $p<0,05$ ), pero no en los tumores inmunonegativos respecto a los inmunopositivos. Se ha observado significado pronóstico para el parámetro supervivencia total para los parámetros delección del gen PTEN ( $p=0,006$ ) y expresión inmunocitoquímica de la proteína VEGF ( $P=0,05$ ), pero no para la proteína PTEN (log rank 0,34,  $p=0,56$ ).

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que la pérdida de heterozigosidad del gen PTEN está implicado en la progresión del astrocitoma fibrilar como un acontecimiento genético tardío. La frecuente asociación entre la pérdida del cromosoma 10 y la LOH del gen PTEN muestra que la pérdida del gen PTEN es frecuentemente no un cambio aislado sino la consecuencia de la pérdida de todo el cromosoma 10, en el que se asienta el gen. Es interesante el hallazgo en nuestro estudio de la delección del gen PTEN en cinco astrocitomas de grado II, dos gemistocíticos y dos fibrilares, de aspecto fenotípico convencional, con expresión de PTEN, sin elevación de la actividad proliferativa respecto a la propia de los astrocitomas de bajo grado. Este resultado contrasta con la publicada ausencia de delecciones del gen PTEN en este subgrupo de astrocitomas. Este hecho requiere de futuros estudios para evaluar su posible utilidad como un marcador precoz de malignización.

**Tabla 1.** Distribución de los loci delecionados para los 4 microsatélites estudiados en función del grado tumoral.

Microsatélite	Grado		
	II	III	IV
<b>D10S579</b>	<b>3/9 (33)</b>	<b>7/13 (54)</b>	<b>33/52 (63)</b>
<b>D10S2491</b>	<b>4/17 (24)</b>	<b>11/19 (58)</b>	<b>35/62 (56)</b>
<b>AFMa086</b>	<b>1/7 (14)</b>	<b>2/5 (40)</b>	<b>12/25 (48)</b>
<b>D10S541</b>	<b>2/14 (14)</b>	<b>7/12 (58)</b>	<b>39/56 (70)</b>

En negrita, casos informativos. En paréntesis, porcentaje de casos delecionados para cada microsatélite.

Nuestros resultados muestran que en todos los astrocitomas gemistocíticos de grado II estudiados existía deleción del gen PTEN, monosomía e inmunorreactividad frente VEGF. Este perfil molecular es similar al observado en los astrocitomas de alto grado, lo que estaría en consonancia con la postulada potencialidad de malignización de este subgrupo de astrocitomas. La deleción del gen PTEN, pero no la expresión de la proteína, se asocia a un aumento de la actividad proliferativa, lo que apoya el papel propuesto de control del ciclo celular para el gen PTEN.

En los astrocitomas de alto grado, pero no en los de bajo grado, la expresión inmunocitoquímica de la proteína PTEN es frecuentemente negativa de acuerdo a un patrón heterogéneo, como ya ha sido publicado. La pérdida focal de la proteína, la aparente sobreexpresión relativa de dicha proteína en un subgrupo de astrocitomas de alto grado, así como la expresión intensa en los vasos acompañantes del tumor, enfatiza la importancia de la referencia histológica en los estudios moleculares de los astrocitomas. El factor VEGF muestra una expresión contraria en los astrocitomas de bajo grado, pero esta relación inversa se pierde en el estudio de los de alto grado cuando se comparan las mismas áreas. Esta ausencia de correlación entre ambas proteínas en los astrocitomas de alto grado pudiera indicar que la relación entre ambos factores es más compleja de lo que se suponía, y que existen otras moléculas relevantes implicadas en el control de la proteína PTEN y de la angiogénesis. Por otro lado, la expresión del RNAm del gen PTEN es significativamente mayor en los astrocitomas de bajo grado que en los de alto grado, y muy inferior a la detectada en el tejido cerebral de referencia. Curiosamente, los astrocitomas de alto grado inmunocitoquímicamente positivos frente a la proteína no muestran una mayor expresión del RNAm del gen PTEN que los negativos. Para explicar esta aparente discrepancia se requiere conocer el significado funcional y el mecanismo de metabolización

de la proteína PTEN detectada inmunocitoquímicamente en los astrocitomas.

Se ha observado que dos parámetros, LOH de la región del gen PTEN y el factor VEGF tienen significado pronóstico. El significado pronóstico de la deleción del gen PTEN es independiente del grado tumoral, y plantea una posible utilidad clínica para este marcador, como ya se había postulado recientemente. Por otro lado, el valor pronóstico del marcador VEGF es igualmente relevante ya que se trata de un marcador que no se asocia con el grado tumoral, con la ventaja de ser más fácil y rápido de determinar que las alteraciones génicas. Este hallazgo confirma varios estudios recientes que postulaban que la expresión de VEGF podría ser un marcador pronóstico independiente. Esto sugiere que el marcador VEGF pueda ser un relevante marcador pronóstico en los astrocitomas, de utilidad en la práctica clínica.

**CONCLUSIÓN**

La pérdida de expresión de la proteína PTEN es un acontecimiento frecuente en los astrocitomas de alto grado según un patrón heterogéneo, pero raramente en los astrocitomas de grado II, y se asocia con la deleción del gen PTEN. Por otro lado, según los resultados de la expresión inmunocitoquímica de los factores PTEN y VEGF comparando las mismas áreas tumorales, la expresión de ambos factores está preservada en los astrocitomas de grado II, pero se pierde en los astrocitomas de alto grado o gemistocíticos. La deleción de la región del gen PTEN y la expresión inmunocitoquímica del factor angiogénico VEGF son alteraciones frecuentes con significado pronóstico independiente en los astrocitomas de alto grado. Se necesitan más estudios para evaluar la posible utilidad clínica de dichos marcadores, así como su posible valor como marcadores precoces de malignización en los astrocitomas de bajo grado.



## Caracterización genética y estudio epidemiológico de las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas en Navarra. Estudio de los niveles de resistencia a los antibióticos. Aplicación al diagnóstico y tratamiento de enfermedades gastroduodenales

M. Iriarte

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Navarra

**Fundamento.** *Helicobacter pylori* es un agente causante de enfermedades gastroduodenales. Este descubrimiento, realizado en los últimos años, ha supuesto el resurgimiento de un nuevo concepto en el tratamiento de este tipo de enfermedades. *H. pylori* coloniza el estómago humano de entre un tercio y la mitad de la población mundial. La infección por *H. pylori* parece producirse en edades tempranas y puede perdurar durante toda la vida. Sin embargo, la evolución puede variar según las personas y mientras que muchas permanecen asintomáticas, otras presentan trastornos gastroduodenales de diferente gravedad. La mayoría desarrolla una gastritis superficial durante las primeras semanas que suele persistir sin mayores consecuencias en la mayoría de los casos. Un subgrupo de las personas infectadas puede desarrollar una úlcera de estómago. En otros, la infección puede dar lugar a una gastritis crónica atrófica. Esta última complicación es probablemente la más importante porque conlleva un alto riesgo de desarrollar posteriormente un proceso cancerígeno. La explicación de la diferente evolución de la enfermedad en los pacientes infectados con *H. pylori* implica varios factores entre los que se incluyen: las diferencias genéticas entre las distintas personas infectadas, la edad a la que se produce la infección, la dieta y, las características de la cepa de *H. pylori* causante de la infección.

Entre los factores de patogenicidad más importantes de *H. pylori* se encuentran el operón *ure* responsable de la producción de la ureasa, *vacA*, que codifica por una toxina vacuolizante, el islote de patogenicidad *cag* responsable de la producción de la proteína CagA, y de la inducción de la respuesta inflamatoria, *babA2* e *iceA* que codifican adhesinas, y *fla* y *fb* que codifican las subunidades de los flagelos.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que la variabilidad genética de *H. pylori* es muy elevada y entre las cepas aisladas se han identificado diferentes alelos de los genes *vacA*, *cag*, *iceA* y *babA2*. Así, aunque la mayoría de las cepas aisladas presenta el gen *vacA*, sólo un 50% de los aislamientos producen una actividad vacuolizante, y esta actividad está correlacionada con la expresión de los alelos s1/m1 y en menor grado s1/m2, pero no con la presencia de los alelos s2/m2 de dicho gen. De la misma forma, no todas las cepas aisladas expresan la proteína CagA. En la mayoría de los países europeos la presencia de los diferentes alelos de estos genes, se ha relacionado con una evolución diferente de la enfermedad. Las cepas que presentan el alelo s1/m1 para el gen *vacA*, expresan normalmente el gen *cagA* y se aíslan con más frecuencia en pacientes con úlcera péptica o carcinoma gástri-

co, y con mucha menor frecuencia en pacientes que padecen sólo gastritis superficial. Estos resultados indican la importancia de un correcto conocimiento de la cepa que causa la enfermedad para poder evaluar las posibles consecuencias de la infección.

El objeto de nuestro trabajo es realizar un estudio de las características genéticas de las cepas aisladas en nuestro laboratorio, y de su relación con las distintas patologías gastroduodenales, así como realizar un estudio de sensibilidad a los distintos antimicrobianos.

**Material y métodos.** Hemos estudiado 242 pacientes que acudieron al Servicio de Digestivo de la Clínica Universitaria de Navarra durante el periodo 2000-2004. En cada paciente se realizó un análisis endoscópico y se tomaron varias biopsias correspondientes a las regiones del antro y cuerpo del estómago. Las biopsias fueron introducidas en un medio de transporte especial para el mantenimiento de *H. pylori*, y llevadas a los laboratorios de Anatomía Patológica y Microbiología.

Los hallazgos endoscópicos se clasificaron en: gastroscopia normal, esofagitis, gastritis según la clasificación del sistema Sydney, úlcera duodenal, úlcera gástrica, úlcera pilórica, cáncer gástrico y otros hallazgos.

Las biopsias remitidas para el estudio anatomopatológico fueron fijadas en formaldehído al 10% e incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 5 mm y se tiñeron con hematoxilina-eosina. La presencia del *H. pylori* se evaluó con la tinción de Giemsa al 2% durante 30 min. En cada biopsia se utilizó la escala visual analógica de la clasificación de Sydney/Houston para evaluar la densidad de bacterias, el grado de inflamación, de actividad, de metaplasia intestinal y de atrofia de la mucosa gastroduodenal.

Las biopsias de antro recibidas en el Servicio de Microbiología se sembraron en el medio de cultivo selectivo comercializado para el caso por la firma Biomerieux (Pylori Agar). Se utilizaron además dos medios no selectivos (agar Columbia con un 5% de sangre de cordero, y agar chocolate). Las placas se cultivaron en una jarra a 37°C con un generador de microaerofilia (*CampyPak Plus*) durante 7 días. Se realizó una impronta de una porción de la biopsia y la tinción de Gram para observar el microscopio óptico la presencia de bacilos gram negativos espirilares, característicos de esta bacteria. Para la identificación bioquímica se estudió la presencia de la ureasa, catalasa y oxidasa. El estudio de las características genéticas de la cepa infectante se realizó mediante análisis por PCR de los genes *vacA* (alelos *s* y *m*), *cagA*, *cagE*, *cagT* y *babA2*.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los 134 cultivos positivos se llevó a cabo mediante E-test (suspensión bacteriana 3-4 de la escala de McFarland). Los antibióticos estudiados fueron metronidazol, claritromicina, doxiciclina, amoxicilina, levofloxacino. Todas estas tiras contienen una concentración gradual del antibiótico que como valor mínimo es de 0,016mg/ml y como máximo 256mg/ml. No hay recomendaciones oficiales respecto a los puntos de corte a utilizar, salvo para el caso de la claritromicina frente a la cual las cepas con una CMI  $\geq$  1mg/ml se consideran resistentes. Por este motivo, a la hora de definir los puntos de corte nos hemos basado para el metronidazol, en los definidos a partir de los últimos ensayos multicéntricos CMI  $\geq$  8mg/ml resistentes, y en el resto de antibióticos hemos utilizado las normas del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) para otros microorganismos.

El estudio serológico se realizó utilizando el kit RIDA Blot *Helicobacter* IgG.

Para el estudio estadístico se utilizó el programa informático SPSS 11 para Windows utilizando para las variables cuantitativas el test de K-W y mid-P. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ .

**Resultados y Discusión.** Hemos obtenido 102 cultivos negativos y 134 cultivos positivos para *H. pylori*. Entre las 82 cepas de *H. pylori* analizadas en nuestro estudio: 56,2% presentaron el genotipo *vacAs1m1* o *vacAs1m2* y *cagA*, *cagE* y *cagT* positivas (genotipo A); 11,2% fueron *vacAs1m1* o *vacAs1m2*, *cagA*, *cagE* y *cagT* negativas (genotipo B) y 32,4% fueron *vacAs2m2*, y *cagA*, *cagE*, y *cagT* negativas (genotipo C). Existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del gen *babA2* y los alelos *vacAs1m1* o *vacAs1m2* y *cagA* (mid-P < 0,001).

No se han encontrado diferencias significativas en la distribución de los distintos genotipos de *H. pylori* (alelos *vacAsm*, genes *cagA,E,T* y alelo *babA2*) entre las cepas aisladas de pacientes de la Comunidad Foral Navarra y zonas limítrofes, y las cepas procedentes de pacientes del resto del país.

Las cepas *vacAs1* y *cagA,E,T* positivas se aislaron con mayor frecuencia en los casos de patologías más graves como úlceras y adenocarcinomas que en los casos de pacientes afectados con gastritis. En ningún caso de adenocarcinoma el *H. pylori* aislado era del genotipo C. Esta afirmación parece válida con independencia del tipo histológico de adenocarcinoma. De las cepas aisladas de pacientes con úlcera, un 73,9% pertenecían al genotipo A, frente a sólo un 8,7% al genotipo B y un 17,4% al genotipo C. Además en los pacientes con gastritis la infección con cepas del genotipo *vacAs1m1*, *cagA,E,T* positivas y *babA2* positivas se asociaba de forma significativa con una mayor densidad de colonización en la zona donde se inicia la infección, un mayor grado de infiltrado inflamatorio en la región del cuerpo, la presencia de lesiones o erosiones epiteliales, y el desarrollo de focos de metaplasia. Los genes *cagA* y *vacA* pueden pues, ser utilizados como marcadores de una cepa que puede producir mayores lesiones en la mucosa y como marcadores de una gastritis severa que puede en un estadio avanzado degenerar incluso en un proceso cancerígeno. Esta afirmación parece válida con independencia del tipo histológico de adenocarcinoma. Las cepas que expresan el alelo *babA2* inducen un mayor grado de inflamación y lesiones epiteliales y se asocia de manera significativa con la presencia de signos de actividad en la mucosa y el desarrollo de focos de metaplasia.

La tasa de resistencia primaria y secundaria a claritromicina fue 9,3 y 42,1% y a metronidazol 21,3 y 40,4%, respectivamente. En el caso de la Comunidad Foral de Navarra y regiones limítrofes fue 5,4 y 35,7% a claritromicina y 10,6 y 28,6% a metronidazol. La tasa de resistencia primaria disminuyó entre los años 2000-2003 en ambos antibióticos mientras que la resistencia secundaria aumentó en el caso de claritromicina y disminuyó ligeramente en el caso de metronidazol. No encontramos ninguna cepa resistente a amoxicilina, ni a doxiciclina. Todo refleja que el factor que más influyó en la aparición de resistencias fue el tratamiento antibiótico previo.

## Valoración de la influencia de los procesos de inflamación en la carcinogénesis pulmonar inducida por agentes químicos. Papel de las células cebadas

E. Erviti<sup>1,2</sup>, D. Blanco<sup>1,2</sup>, S. Vicent<sup>1,2</sup>, E. Elizegi<sup>2</sup>, I. Pino<sup>2</sup>, L. M. Montuenga<sup>1,2</sup>, M. Garayoa<sup>1,2</sup>

1. Área Oncología. División Carcinogénesis. Centro para la Investigación Médica Aplicada (CIMA). Clínica Universitaria de Navarra.

2. Departamento de Histología y Anatomía Patológica. Universidad de Navarra. Pamplona.

### FUNDAMENTO

Las células cebadas (CC) son el principal tipo de células inflamatorias responsable de las reacciones alérgicas. Sin embargo, desde hace tiempo también es conocida su acumulación alrededor de determinados tipos de tumores, y la producción por parte de dicho tipo celular de gran cantidad de factores de crecimiento y de supervivencia, factores angiogénicos, interleuquinas, quimioquinas y proteasas de matriz extracelular que podrían favorecer el desarrollo y la metástasis tumoral. Este proyecto de investigación se centra en la valoración de la influencia de las CC en el desarrollo de cáncer de pulmón no microcítico. Para ello se han realizado estudios para la localización de este tipo celular y su posible relación con la red capilar en un modelo de carcinogénesis pulmonar en rata y sobre biopsias humanas de cáncer de pulmón. También se han llevado a cabo estudios *in vitro* utilizando distintas líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico con el medio condicionado de una línea celular de CC activadas, así como análisis de la expresión génica mediante *microarray* de la línea de CC en distintas condiciones de activación.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Estudios basados en la localización de células cebadas en cáncer de pulmón

- Modelo *in vivo* de carcinogénesis pulmonar inducida por una única instilación intratraqueal de cristales de sílice en rata (16 mg). Se procesaron los pulmones desde 1 a 20 meses después de la instilación, fijándolos por inmersión en formaldehído tamponado al 4% e incluyéndolos en parafina. Las CC se pusieron de manifiesto mediante la tinción de hematoxilina-fast green-safranina y los vasos sanguíneos por inmunohistoquímica con un anticuerpo frente a laminina que marca la lámina basal que rodea a los vasos.

- Biopsias de tumores pulmonares humanos no microcíticos (pertenecientes al Proyecto Europeo de Biomarcadores de Cáncer de Pulmón, Departamento de Neumología, Clínica Universitaria de Navarra). Los tumores pertenecían a estadios precoces de adenocarcinomas (incluyendo carcinomas broncoalveolares) (15 casos) y de carcinomas escamosos (22 casos), fijados en formaldehído tamponado al 4% e incluidos en parafina. Utilizando técnicas inmunocitoquímicas las CC se pusieron de manifiesto utilizando un anticuerpo frente a triptasa, mientras que para el marcaje del endotelio capilar se empleó un anticuerpo frente a CD34. Sobre los cortes de tejido tumoral también se

analizó la inmunoreactividad para las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9.

Tanto en el modelo de rata como en las biopsias, el recuento del número de CC y de vasos sanguíneos/área endotelial se llevó a cabo en cortes seriados especulares mediante el programa de análisis de imagen *analySIS*® 3.1. Este recuento se realizó tanto en zonas de alta densidad de CC como en zonas de baja densidad de dicho tipo celular en la misma preparación (estableciéndose una diferencia mínima de 10 CC entre ambas zonas). Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 11.0, y las diferencias se consideraron significativas si  $p < 0,05$  y muy significativas si  $p < 0,01$ .

#### Estudios *in vitro*

- La línea celular de CC HMC-1 se diferenció durante 24 h con éster de forbol (TPA) (50 ng/ml), y posteriormente se activó con ionóforo de  $Ca^{2+}$  A23187 (0,2 mM) durante 14 h para permitir tanto la degranulación como la secreción de proteínas sintetizadas *de novo* al medio. Se realizaron ensayos colorimétricos de proliferación (MTT) a las 24, 48 y 72 h para distintas líneas celulares humanas establecidas de cáncer de pulmón de tipo adenocarcinoma (A549, H23, H1264 y H441) y de tipo carcinoma escamoso (H157 y HTB-58), crecidas con el medio condicionado de la línea de CC HMC-1 activada. Como controles se utilizaron: medio condicionado de la línea HMC-1 sin tratar o tratada con etanol (vehículo del ionóforo), y medio de cultivo de la línea HMC-1 con o sin ionóforo.

- Estudios con *microarrays* para comparar perfiles de expresión de la línea HMC-1 sin activar o tras activación con TPA y A23187 (realizados en colaboración con el Dpto. de Biotecnología, CUN). Se utilizaron *microarrays* de oligómeros de DNA (20000 genes humanos) sobre cristal, fabricados en la Universidad de Cincinnati (*Genomics and Microarray Laboratory, USA*), y los datos obtenidos se analizaron mediante el sistema *MicroArray Normalizer* (MAN).

### RESULTADOS

1. Modelo de carcinogénesis pulmonar en rata: el número de CC en pulmón normal es muy escaso y están presentes alrededor de bronquios y bronquiolos. Sin embargo, tanto en las lesiones preneoplásicas del modelo (hiperplasias y lesiones adenomatosas) como en las neoplásicas (adenocarcinomas y carcinomas escamosos), el número de CC es significativamente mayor que en el pulmón normal, localizándose principalmente en el estroma conjuntivo de dichas lesiones.

Entre los dos tipos de tumores que aparecen en el modelo, se observó que el número de CC era significativamente mayor en carcinomas escamosos que en adenocarcinomas; dentro de las lesiones preneoplásicas encontradas, las hiperplasias presentaron un mayor número de CC que las lesiones adenomatosas.

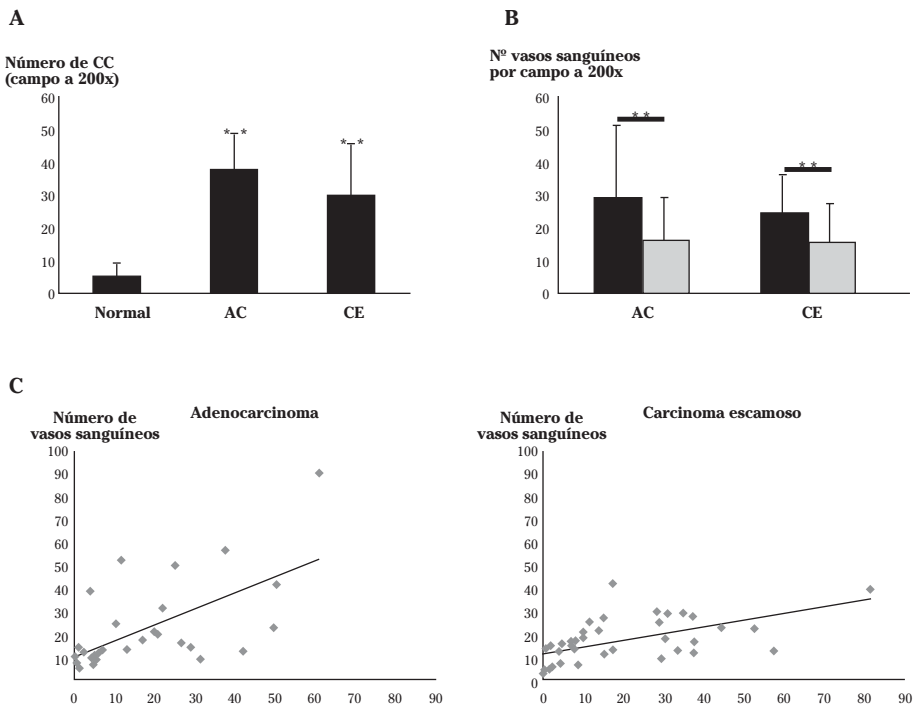
En los estudios de análisis de imagen para vasos sanguíneos/área endotelial en lesiones neoplásicas, no se encontraron diferencias significativas para ninguna de estas variables entre zonas de alta y baja densidad de CC. No así en las lesiones neoplásicas, donde se observó que tanto el número de vasos sanguíneos como el área endotelial eran significativamente mayores en aquellas zonas con un mayor número de CC; además, se encontró una correlación positiva significativa entre estas dos variables y el número de CC.

2. Biopsias humanas: se observó que el número de CC era significativamente mayor en los dos tipos de tumores estudiados (adenocarcinomas y carcinomas escamosos), en comparación con tejido pulmonar normal de cada paciente (Fig. 1A). No se encontraron diferencias significativas en el número de CC entre ambos tipos tumorales.

Paralelamente a lo observado en el modelo animal, tanto en adenocarcinomas como en carcinomas escamosos, el número de vasos sanguíneos (Fig. 1B) y el área endotelial eran significativamente mayor en las zonas de alta densidad de CC en comparación con zonas de baja densidad de dicho tipo celular. Existía además una correlación significativa positiva entre el número de CC y el número de vasos sanguíneos (Fig. 1C), así como entre el número de CC y el área endotelial.

Por último, no se encontró inmunomarcaje para las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en las células cebadas (la expresión de MMP-2 se localizó en las células tumorales epiteliales, en el epitelio bronquiolar y en el músculo liso de los vasos sanguíneos, mientras que el marcaje para MMP-9 se observó en las células tumorales y el endotelio de los vasos sanguíneos). No se encontró asociación entre la expresión de dichas metaloproteasas y otras características como el estadio, el tipo tumoral o el número de CC.

3. Estudios *in vitro* con medios condicionados: se observó que el medio condicionado de la línea de CC HMC-1 previamente diferenciada con TPA y activada



**Figura 1.** Estudio de la presencia de células cebadas en biopsias humanas de tumores pulmonares no microcíticos y su relación con el número de vasos sanguíneos. (A) Existe un aumento muy significativo del número de células cebadas (CC) en ambos tipos de tumores, adenocarcinomas (AC) y carcinomas escamosos (CE), en comparación con zonas de pulmón normal de cada paciente. No existen diferencias significativas en el número de células cebadas entre ambos tipos de tumores. (B) Tanto en AC como en CE se observa que el número de vasos sanguíneos es significativamente superior ( $p < 0,001$ ) en las zonas con alto número de CC (negro) que en las zonas con bajo número de CC (gris). (C) Para ambos tipos de tumores se observa una correlación significativa positiva entre el número de CC y el número de vasos sanguíneos.

con ionóforo A23187 disminuía significativamente la proliferación de todas las líneas celulares tumorales epiteliales estudiadas con respecto a los otros medios controles.

4. Estudios con *microarrays*: se estudiaron mediante análisis con *microarray* muestras de RNA total de la línea HMC-1 tras 1 h y 6 h de activación con TPA y A23187, tras 6 h de tratamiento con etanol (utilizado como vehículo de TPA y del ionóforo) y sin tratamiento. Tras el análisis de los datos, se obtuvo una lista de genes cuya máxima expresión se producía tras 6 h de tratamiento. De estos genes se seleccionaron varios cuya función proteica sugería en principio que pudieran influir en la progresión neoplásica, para los cuales se validaron los resultados de *microarray* con la técnica de RT-PCR. Actualmente se investiga su posible papel en la contribución de las CC en la carcinogénesis pulmonar.

#### CONCLUSIONES

Tanto en los estudios con biopsias pulmonares humanas como en el modelo de carcinogénesis pulmonar en rata, se ha observado una correlación positiva en las lesiones neoplásicas (adenocarcinomas y carci-

nomas escamosos) entre el número de CC y la red capilar/área endotelial. Esto parece ser indicativo de que las CC puedan tener un papel significativo en la activación del proceso angiogénico (bien por secreción directa de factores angiogénicos o por activación de factores secuestrados en la matriz extracelular) en la etapa inicial del desarrollo neoplásico, antes de que sean las propias células tumorales las que controlen directamente la formación de nuevos vasos. Este papel se ha confirmado para las CC en un modelo en ratón de carcinogénesis epitelial de tipo escamoso.

Nuestros experimentos *in vitro* de cultivo de distintas líneas celulares epiteliales tumorales de pulmón con el medio condicionado de una línea celular de CC activada, no parecen indicar que los factores secretados por las CC tengan un efecto estimulador de la proliferación en el epitelio neoplásico. No puede descartarse, sin embargo, que sea necesario un contacto directo entre ambos tipos celulares, o la activación de los factores producidos por las CC por parte de otros mediadores en la matriz extracelular. A este efecto, sería interesante completar este estudio con experimentos de cocultivos de CC y células tumorales pulmonares sobre algún tipo de matriz extracelular.

---

## Ratones transgénicos para UCH-L1 humana mutada (Ile93Met) como modelo "in vivo" de enfermedades neurodegenerativas humanas con cuerpos de Lewy

T. Gómez-Isla, M.T. Sesma, C. Agudo, J.F. Cabodevilla, S. Catena, M. Nieto, L. Samaranch  
Centro para la Investigación Médica Aplicada (CIMA). Universidad de Navarra. Pamplona.

**Fundamento.** Aunque la etiología de la enfermedad de Parkinson (EP) y la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) sigue siendo desconocida, la contribución de factores genéticos en estas patologías neurodegenerativas ha ganado una atención notable tras la identificación en los últimos años de mutaciones en varios genes asociadas a formas familiares de enfermedad. Uno de estos genes es el que codifica para la hidrolasa del extremo carboxilo terminal de la ubiquitina (UCH-L1). Pese a haberse demostrado que las mutaciones en el gen de la UCH-L1 son una causa muy infrecuente de EP familiar autosómica dominante, 3 hechos apoyan la probable implicación de este gen en la patogenia de las enfermedades humanas con cuerpos de Lewy tales como la EP y la DCL:

1. La UCH-L1 es una de las proteínas más abundantes en el sistema nervioso central donde representa hasta un 2% del total de su contenido proteico.

2. Se ha demostrado la presencia de esta proteína en los cuerpos de Lewy (LB), la lesión histopatológica característica de la EP y la DCL.

3. La UCH-L1 pertenece a una familia de enzimas desubcituinizantes que hidroliza los polímeros de ubiquitina a monómeros libres, de tal forma que mutaciones en el gen que codifica para esta proteína podrían teóricamente interferir con la eliminación vía ubiquiti-

na-proteasoma de proteínas defectuosas y así facilitar su acúmulo anormal en la célula.

Hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto por el que la mutación Ile93Met en el gen de la UCH-L1, originalmente descrita en una familia alemana con EP, causa la enfermedad. Experimentos en *E. coli* han demostrado que la presencia de dicha mutación se asocia a una reducción del 50% de la actividad catalítica del isoenzima lo que podría desencadenar una agregación anómala de proteínas en el SNC.

En el presente proyecto, nos propusimos crear nuevas líneas de ratones transgénicos que expresasen en su cerebro UCH-L1 humana mutada. El principal objetivo ha sido investigar si dicha estrategia desencadena en ratones un fenotipo similar al de la EP y/o otras patologías relacionadas con LB en humanos.

**Material y métodos.** Se llevó a cabo la clonación de los cDNA que codifican para la proteína UCH-L1 humana conteniendo la mutación Ile93Met (UCH-L13M), UCH-L1 humana conteniendo una delección del exon 1 más la mutación Ile93 Met (UCH-L1Δ1/I93M) y la forma nativa (UCH-L1wt) bajo el control de los promotores PDGF-β y Thy-1. Tras secuenciar cada una de las construcciones obtenidas (PDGF-βUCH-L1Δ1/I93M, PDGF-βUCH-L1wt, Thy-1UCH-L1Δ1/I93M, Thy-1 UCH-L1wt, Thy-1UCH-L1I93M y Thy-1UCH-L1wt) se procedió

a su microinyección en embriones en fase unicelular procedentes de la cepa híbrida C57B/6Jx SJL.

A partir de ADN obtenido de fibroblastos de la cola se llevó a cabo un screening de todos los posibles fundadores mediante técnicas de Dot Blot y PCR, procediéndose a la expansión de las líneas transgénicas con mayor número de copias del transgen del interés para su posterior caracterización fenotípica clínica y patológica. La determinación de los niveles de expresión de proteína transgénica se llevó a cabo en homogeneizados de cerebros congelados mediante técnicas de Western Blot.

El estudio del fenotipo clínico se basó en la monitorización diaria de los animales en sus jaulas en búsqueda de signos motores obvios semejantes a la EP en humanos tales como rigidez, temblor y/o bradi/aquinesia, así como en una evaluación de la función motora global utilizando el test del rotarod (Ugo Basile modelo 7650). Este modelo está dotado de un cilindro rotatorio equipado de un motor silente incorporado a la unidad que proporciona una aceleración progresiva de 3 a 30 revoluciones por minuto en 5 minutos. Los ratones corren en esta cinta rotatoria cuatro veces al día (duración máxima de 10 minutos por cada intento) durante cuatro días consecutivos y se mide el tiempo de permanencia en la cinta sin caerse en cada uno de los intentos.

Se sacrificaron de forma indolora mediante inhalación de CO grupos de ratones transgénicos positivos y negativos procedentes de las mismas para su estudio histopatológico. Se procesaron de secciones cerebrales coronales de 30  $\mu$ m de espesor para su tinción inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para UCH-L1,  $\alpha$ -sinucleína, ubiquitina, tirosina hidroxilasa y GFAP, destinados, entre otros, a la identificación de inclusiones intraneuronales (cuerpos de Lewy) y a la evaluación de la integridad anatómica de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc).

Se estudiaron animales de edades comprendidas entre 3 y 14 meses.

**Resultados.** Se obtuvieron 20 fundadores conteniendo los transgenes PDGF- $\beta$ UCH-L1wt, Thy-1UCH-L1 $\Delta$ 1/193M o Thy-1UCH-L1193M. De ellos, un total de 8 tuvieron descendencia dando origen a otras tantas líneas transgénicas (Tg118, Tg119, Tg123, Tg124, Tg2952,

Tg2978, Tg2979 y Tg2952). La presencia de los transgenes de interés se comprobó en cada una de dichas líneas mediante Dot Blot y PCR. Los niveles de expresión en cerebro de proteína transgénica, comprobados mediante Western-Blot, oscilaron entre 1-2 unidades, siendo una unidad el equivalente a los niveles de expresión de UCH-L1 murina endógena. El estudio del fenotipo clínico-patológico se llevó a cabo en grupos de animales transgénicos positivos y negativos procedentes de la misma camada a las edades de 3-4, 7-9 y 11-14 meses.

La monitorización diaria de los animales en sus jaulas no demostró signos motores deficitarios obvios en ninguna de las líneas creadas. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la función motora global de los animales transgénicos positivos frente a los controles transgénicos negativos tras su evaluación mediante el test del rotarod. Se pusieron de manifiesto diferencias en el rendimiento en este test entre animales jóvenes y viejos, independientemente de su estado transgénico, siendo el tiempo de permanencia en el rotarod significativamente inferior en los animales viejos en comparación con los animales jóvenes. El procesamiento y tinción de secciones cerebrales de 30  $\mu$ m de espesor con anticuerpos específicos para UCH-L1,  $\alpha$ -sinucleína, ubiquitina, tirosina hidroxilasa y GFAP, no permitió demostrar en ninguna de las líneas estudiadas la presencia de inclusiones intraneuronales (cuerpos de Lewy), pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y/o cambios glióticos en esta u otras regiones cerebrales.

**Conclusiones.** La sobreexpresión de UCH-L1 humana conteniendo la mutación I93M en el cerebro de ratones de la cepa híbrida C57B/6Jx SJL no se asocia a la aparición de rasgos fenotípicos clínico-patológicos de EP u otras patologías con cuerpos de Lewy.

Es posible que la aparición de dichos rasgos fenotípicos requiera la presencia adicional de otras proteínas presentes en los cuerpos de Lewy, además de la propia UCH-L1, y/o la interacción con toxinas ambientales tales como el MPTP o la rotenona. De forma alternativa, podrían requerirse niveles de sobreexpresión de proteína transgénica más elevados y/o una cepa diferente a la híbrida C57B/6JxSJL para desencadenar en estos animales un fenotipo similar al de la EP en humanos.



## Importancia de la metionina adenosiltransferasa en la iniciación de la lesión hepática. Estudio en un modelo de ratón “knockout” del gen MAT1A

M.A. Ávila, E. Ruiz García-Trevijano, M.L. Martínez-Chantar

Centro para la Investigación Médica Aplicada (CIMA). Universidad de Navarra. Pamplona.

### FUNDAMENTO

El metabolismo hepático de la metionina implica además de la incorporación de este aminoácido esencial en la síntesis de proteínas, su conversión a expensas del ATP, en S-adenosilmetionina (AdoMet). La AdoMet es una molécula clave en el metabolismo celular, que actúa como donante de grupos metilo en las reacciones de transmetilación y como precursora de la síntesis de poliaminas y como fuente de cisteína para la producción de glutatión (GSH).

En mamíferos la síntesis de AdoMet es llevada a cabo por la enzima metionina adenosiltransferasa (MAT). La MAT es el producto de dos genes diferentes MAT1A y MAT2A, que codifican respectivamente para las dos isoenzimas MAT I/III y MAT II. La expresión de ambos genes está finamente regulada. El gen MAT1A se expresa predominantemente en el hígado adulto, donde la expresión de MAT2A es menos del 5% de la de MAT1A, y en el resto de los tejidos sólo se expresa MAT2A. Los mecanismos de regulación y propiedades cinéticas de ambas isoenzimas son diferentes, así la forma mayoritariamente expresada en el hígado adulto (MAT I/III, producto del gen MAT1A) está adaptada para la función metabólica de este órgano, donde se cataboliza hasta el 50% de la metionina derivada de la dieta. En cambio MATII, el producto de MAT2A, contribuye a mantener unos niveles adecuados de AdoMet para el funcionamiento celular independiente de los cambios en las concentraciones de metionina circulante, si bien su expresión se induce durante el crecimiento celular. De forma similar, en condiciones en las que el hepatocito prolifera, como sucede durante el desarrollo embrionario, la regeneración y la transformación neoplásica del hígado, la expresión de MAT1A se reprime mientras que MAT2A se induce. En la célula hepática este cambio en la expresión de ambos genes puede influir en procesos celulares como el crecimiento celular y la expresión génica. En este sentido se ha demostrado que la expresión alternativa de MAT1A o MAT2A en células de origen hepático condiciona los niveles intracelulares de AdoMet, siendo éstos mayores cuando el gen expresado es MAT1A, y que en estas condiciones la proliferación celular disminuye. Además la adición de AdoMet a células de hepatocarcinoma en cultivo, o la administración *in vivo* de AdoMet en modelos de hepatocarcinogénesis, resulta en una sensible reducción del crecimiento celular anormal y en la prevención del desarrollo de lesiones preneoplásicas.

Alteraciones en la síntesis de AdoMet asociadas a situaciones de daño hepático se han descrito tanto en modelos experimentales de intoxicación aguda y crónica, como también en pacientes cirróticos de distinta etiología (alcohol, virus C). La administración de

AdoMet a estos modelos experimentales de lesión hepática y a pacientes con cirrosis alcohólica, resulta en un claro efecto hepatoprotector y en un aumento de la supervivencia de los pacientes. Por tanto el mantenimiento de unos niveles adecuados de AdoMet en el hepatocito parece ser esencial para preservar las funciones metabólicas y diferenciadas de este tipo celular. Esta hipótesis está apoyada por distintas evidencias experimentales, entre las que destacan el hecho de que la administración a roedores de dietas deficientes en grupos metilo (metionina y colina), que comprometen la disponibilidad de la AdoMet, resulta en la inducción de tumores hepáticos. Además observaciones de nuestro laboratorio muestran que la adición de AdoMet a cultivos primarios de hepatocitos de rata previene la desdiferenciación inducida por el cultivo, manteniendo la expresión de MAT1A y reprimiendo la inducción de MAT2A.

En conjunto estas observaciones sugieren que la alteración en la síntesis de AdoMet puede jugar un papel importante en la génesis de la lesión hepática, y en el control de mecanismos genéticos relacionados con el mantenimiento de estado de diferenciación del hígado. Sin embargo, todavía no se han proporcionado evidencias directas *in vivo* que demuestren que la reducción en los niveles de AdoMet en el hepatocito contribuya directamente a la lesión y desdiferenciación hepatocelular y no sea un mecanismo secundario o consecuencia de la misma. La mayoría de los protocolos experimentales en que se induce daño hepático, descritos anteriormente, además de reducir los niveles de AdoMet afectan simultáneamente numerosos procesos celulares. Este hecho dificulta la identificación de aquellos mecanismos que serían especialmente sensibles a la reducción de los niveles hepatocelulares de AdoMet. Estas consideraciones nos han llevado en nuestro laboratorio a generar un modelo de ratón deficiente en la expresión del gen MAT1A.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos estudiado las características morfológicas e histológicas del hígado en el ratón MAT0 comparándose con la de los correspondientes animales control. También se han determinado metabolitos relacionados con el ciclo de la metionina en el tejido hepático, así como marcadores de lesión hepática. Se ha realizado un estudio de los perfiles de expresión génica en el hígado de los ratones MAT0 y controles a diferentes edades, empleando “*microarrays*” de oligonucleótidos (*Affymetrix*). Se ha estudiado la respuesta de estos animales al daño hepático agudo en el modelo de administración intraperitoneal de CC14. También se ha estu-

diado la respuesta de los ratones MAT0 durante la regeneración hepática tras hepatectomía parcial (HP).

## RESULTADOS

El primer objetivo fue estudiar las consecuencias fisiológicas, bioquímicas y moleculares de la reducción persistente de los niveles de AdoMet en el hígado durante el crecimiento, maduración y envejecimiento de los animales "knockout" del gen MAT1A. En este sentido el trabajo realizado durante este proyecto ha permitido conocer que la deficiencia persistente de AdoMet en el hígado implica el desarrollo de un patrón aberrante de expresión génica en este órgano. El análisis bioinformático de los datos obtenidos mediante tecnología de "DNA Arrays" en hígados de animales "wild type" y "knockout" de tres meses de edad sugiere un fenotipo proliferativo acompañado de significativos cambios en la expresión de genes que codifican para enzimas del metabolismo de lípidos y carbohidratos. A los ocho meses de edad estos animales desarrollan esteatohepatitis; es interesante destacar que la expresión de genes asociados a esta condición patológica (tales como UCP2, CYP2E1) ya se encuentra alterada en los animales de tres meses de edad. Estos animales presentan niveles anormalmente elevados de glucosa circulante, y de triglicéridos hepáticos, lo cual es compatible con el perfil de expresión génica que se ha mencionado anteriormente y el desarrollo de esteatohepatitis. El estudio de estos animales a otras edades permitió observar que a los 18 meses de edad el 60% de los mismos desarrolla hepatocarcinoma de manera espontánea.

En este modelo se proponía estudiar también la respuesta a protocolos de daño hepático agudo. Uno de los modelos más empleado es la administración de una sola dosis de CCl<sub>4</sub> intraperitoneal, y la valoración del daño hepático a las 24 h de la administración del tóxico. La deficiencia crónica de AdoMet en el hígado de animales de tres meses de edad eleva significativa-

mente la sensibilidad a agentes hepatotóxicos como el CCl<sub>4</sub>. El CCl<sub>4</sub> media sus efectos nocivos en parte por su metabolismo catalizado por el citocromo CYP2E1. La expresión de este citocromo se encuentra elevada en el hígado de los ratones "knockout", como consecuencia de los niveles persistentemente reducidos de AdoMet.

Otra interesante observación surgió del estudio de la regeneración hepática tras HP en los ratones MAT0. La respuesta a este estímulo de proliferación hepatocelular fue completamente anómala en los ratones MAT0. La síntesis de DNA en las células parenquimales hepáticas de los ratones MAT0 fue muy inferior a la de los animales control a las 48 h de la intervención. Es interesante destacar que los hepatocitos aislados en cultivo de estos animales mostraron una síntesis basal de DNA muy superior a la de ratones WT; sin embargo, cuando fueron estimulados para proliferar con HGF los hepatocitos de los ratones MAT0 no respondieron adecuadamente.

## CONCLUSIÓN

Nuestras observaciones realizadas en un modelo experimental *in vivo* de deficiencia crónica de AdoMet demuestran claramente el papel fundamental de la AdoMet en el control de las funciones biológicas esenciales del hígado. Hemos demostrado que la preservación de los niveles hepáticos de AdoMet es fundamental para el adecuado control de procesos como son la proliferación celular, la diferenciación y la muerte celular. Estos datos contribuyen a explicar los mecanismos del efecto hepatoprotector de la AdoMet observados tanto en modelos experimentales como en pacientes con cirrosis alcohólica crónica. El uso de la AdoMet podría ser de interés terapéutico en el control de la lesión hepática inducida por el consumo crónico de alcohol, condición patológica que carece en la actualidad de tratamiento.