

Genotipo de apoE y variantes genéticas en la región promotora del gen de apoE en el ictus aterotrombótico

I. Jericó¹, A. Cenarro², M. Artieda², T. Ayuso³, J. Gállego³, F. Civeira²

1. Sección Neurología (Hospital Reina Sofía. Tudela).
2. Laboratorio de Investigación Molecular (Hospital Miguel Servet. Zaragoza).
3. Servicio de Neurología (Hospital de Navarra. Pamplona).

Introducción. La aterosclerosis es una enfermedad sistémica que afecta a arterias de mediano y gran calibre de todo el organismo, de naturaleza inflamatoria según las últimas hipótesis. Una de las consecuencias clínicas de esta enfermedad arterial es el ictus aterotrombótico.

El primer paso para la formación de la lesión ateroesclerosa es un daño o disfunción endotelial mediada por factores hemodinámicos y otros factores bien conocidos como son la dislipemia, hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus (DM), tabaquismo, etc. El mecanismo propuesto para la formación de la aterosclerosis es la hipótesis referida al daño que produce la respuesta a esta lesión endotelial a través de la activación de diferentes genes implicados en la activación endotelial y la respuesta inflamatoria.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes entrarán al interior de la pared vascular donde el LDL será oxidado (LDLox), potenciando así su poder aterogénico. Las moléculas de adhesión celular expresadas por el endotelio atraen a monocitos circulantes, que penetrarán al interior de la pared donde se transformarán en macrófagos que internalizan la LDLox a través de receptores *scavengers* (recolectores o barrenadores) formándose las células espumosas.

El macrófago es un elemento clave en la aterosclerosis, interviniendo tanto en el proceso de captación lipídica como en el transporte reverso de colesterol expresando proteína ABCA1 y apolipoproteína E (apoE). La apoE es sintetizada por múltiples células del cuerpo. Forma parte como apolipoproteína transportadora de VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), quilomicrones y HDL (lipoproteínas de alta densidad), además de ser el ligando para el receptor hepático de partículas remanentes (LRP). El alelo E4 se asocia a niveles elevados de LDL y colesterol total, siendo un factor de riesgo independiente para la cardiopatía isquémica. Su asociación con el ictus es controvertida. En la lesión ateroesclerosa se ha detectado gran cantidad de apoE sintetizada a este nivel por los macrófagos, teniendo una función antiaterogénica al favorecer

el transporte reverso de colesterol. Los polimorfismos de la región promotora del gen de apoE son algunos de los múltiples factores que pueden influir en la expresión de apoE por el macrófago. Se han descrito varios polimorfismos o variantes genéticas en el promotor de este gen que modifican la actividad transcritora del gen destacando el -491A/T que disminuye la actividad promotora y el -219G/T que aumenta la actividad promotora.

El objetivo del presente trabajo es determinar si existe asociación entre el genotipo de apoE y los polimorfismos -491A/T y -219G/T del promotor del gen con el ictus aterotrombótico.

Material y método. Se han recogido de forma prospectiva muestras sanguíneas previo consentimiento informado a 150 pacientes con diagnóstico de ictus aterotrombótico (criterios TOAST) ≤ 70 años (44-70 años) (media 60,3). Como control muestras sanguíneas a 103 recién nacidos sanos consecutivos, 114 muestras sanguíneas a sujetos > 80 años sin patología vascular sintomática y a 148 sujetos normolipémicos con edad media 59 años (40-78 años). El DNA genómico se extrae de células nucleadas. La secuencia a estudio se amplifica por PCR y se digiere posteriormente por las enzimas de restricción correspondientes (Hha I para el genotipo, Dra I para el polimorfismo -491 A/T y Taq I para el polimorfismo -219G/T). Los fragmentos obtenidos se analizan por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%.

Conclusiones.

1. La presencia del alelo E4 es un factor de riesgo para el ictus aterotrombótico especialmente en sujetos menores de 55 años.
2. La prevalencia de E4 en nuestro grupo control es del 7% similar a la de otras poblaciones del sur de Europa.
3. El alelo E2 no parece tener un efecto protector para el ictus aterotrombótico
4. El polimorfismo -491A/T (presencia del aleloT) es un factor de riesgo para el ictus aterotrombótico.

Disregulación del ciclo celular y factores moleculares de pronóstico clínico en tumores del sistema nervioso

J.S. Castresana, X. Fan, J. Muñoz, M.M. Inda

Universidad de Navarra.

Fundamento. Los astrocitomas son un grupo de tumores cerebrales derivados de los astrocitos. Junto a los oligodendrogliomas y a los ependimomas constituyen el grupo de los denominados gliomas. Dentro de los gliomas, los astrocitomas, son, a su vez, los tumores más frecuentes, y dentro de ellos, especialmente el glioblastoma. No se conocen bien las alteraciones genéticas que conducen a la génesis de los astrocitomas. Entre los genes que participan en la progresión tumoral de astrocitomas de bajo a alto grado se encuentra p53, mientras que las alteraciones de EGFR y PTEN parece que conducen a la génesis de glioblastomas primarios. Este trabajo pretende contribuir al mejor conocimiento de los factores genéticos etiológicos de los astrocitomas humanos. Para ello se han determinado, mediante CGH (hibridación genómica comparada) los loci genéticos que participan en la génesis de astrocitomas. Una vez determinados esos loci, se han estudiado algunos de los más representativos mediante técnicas moleculares de detección de mutaciones, deleciones y/o hipermetilación de promotores.

Material y métodos. Se dispone de DNA genómico extraído de 60 astrocitomas correspondientes a muestras quirúrgicas obtenidas de pacientes operados en el Instituto de Neurocirugía de la Universidad de Tianjin, China. En concreto: 22 glioblastomas, 20 astrocitomas anaplásicos y 18 astrocitomas de bajo grado. También se dispone de 12 líneas celulares de astrocitomas, algunas de las cuales portan una mutación en el gen PTEN. Finalmente, contamos con una colección de unas 50 muestras de sangre de donantes sanos a partir de las cuales se ha obtenido DNA, que representa el control de normalidad en los experimentos a realizarse. Las fases metodológicas del estudio son las siguientes:

1. Realización de CGH, como técnica de *screening* molecular.
2. Análisis de mutaciones en PTEN y otros genes cuyos loci se revelen como candidatos tras los experimentos de CGH. Para la detección de mutaciones se utilizará PCR-SSCP-secuenciación automática. Para estudio de deleciones y de amplificación génica: PCR diferencial. Para el estudio de hipermetilación al nivel de promotor de p16, la MSP (*Methylation sensitive PCR*)

Resultados. CGH. Hemos analizado el DNA de 24 glioblastomas guardados a -80°C desde la cirugía. Los resultados muestran que es más frecuente la amplificación que la deleción de loci, por lo que se sospecha que participan más oncogenes que genes supresores de tumores en el desarrollo del glioblastoma. Las amplificaciones corresponden a los cromosomas 17 (71% de los tumores), 20 (71%), 22 (58%), 16 (58%), 7 (58%), 12

(46%), entre otros, mientras que las deleciones se asocian más frecuentemente a los cromosomas 13 (42%), 10 (33%), 4 (30%), 18 (30%) y 9 (25%). Todo ello confirma que, posiblemente el desarrollo de glioblastomas podría estar ligado a amplificación de EGFR (cromosoma 7) y ERBB2 (cromosoma 17), además de a otros loci, mientras que las deleciones podrían asociarse a pérdida de función de los genes supresores de tumores RB (cromosoma 13), p16 (cromosoma 9), PTEN y DMBT1 (cromosoma 10). Por el contrario, p53, en el cromosoma 17, no se mostró afectado.

GEN p16. El gen p16 se estudió en 21 GBMs, no revelando mutación alguna en sus 3 exones. No se han detectado todavía mutaciones de p16 en ninguno de los 25 astrocitomas de grado II y III analizados, aunque hay PCR-SSCPs positivos en dos casos (un astrocitoma de grado II y otro de grado III) que habrán de caracterizarse mediante secuenciación. Sin embargo, 6 GBMs de 21 (29%), y 2 astrocitomas de grado II (2/12, 17%) presentaron deleciones homocigóticas de p16. También se demostró, mediante MSP que el promotor de p16 sufría hipermetilación en 2 de los 21 GBMs (9%), así como en un astrocitoma de grado II (1/12, 8%).

GEN PTEN. Sólo se detectaron alteraciones de PTEN en los GBMs, en concreto: 5 mutaciones en un total de 22 GBMs (23%), así como 3 deleciones homocigóticas entre los 22 GBMs (14%).

GEN DMBT1. Se detectaron deleciones homocigóticas de DMBT1 en 1 de 14 GBMs, y 2 de 12 astrocitomas de grado II. El estudio se hizo extensible a 20 líneas celulares de tumores del sistema nervioso (9 astrocitomas, 7 meduloblastomas/PNET, 3 neuroblastomas, y un neuroglioma) de las cuales 3 mostraron deleciones de DMBT1: un astro-oligodendroglioma, un neuroglioma y un neuroblastoma.

Conclusiones. 1) Tras estos estudios concluimos que los genes p16, PTEN y DMBT1 muestran alteraciones (mutaciones, deleciones homocigóticas, e hipermetilación de promotor en el caso de p16) que producen su propia inactivación funcional en astrocitomas de bajo y alto grado. Las frecuencias de tumores alterados corresponden a 13/20 GBMs (65%), y 5/12 astrocitomas de grado II (42%). Entre los astrocitomas anaplásicos (grado III) sólo encontramos una sospecha de mutación de p16.

2) En los GBMs, la proporción de lesión del gen PTEN y del p16 es la misma, mientras que DMBT1 se ve menos dañado (8/20 p16, 7/20 PTEN, 1/14 DMBT1, 3/20 PTEN y p16 en el mismo caso). Entre los astrocitomas de bajo grado, hay 4/12 lesiones de p16, y 2/12 del gen DMBT1 (en 1/12 la lesión es en los dos genes); PTEN no mostró alteraciones en astrocitomas II.

3) Las alteraciones de PTEN sólo se detectan en GBMs. Tal vez una lesión de PTEN detectable en un astrocitoma anaplásico nos haría pensar que ese astrocitoma puede evolucionar a GBM, y, por tanto presentar un peor pronóstico, pero eso queda por ser demostrado.

4) p16 es el segundo gen más frecuentemente mutado en nuestra serie, y curiosamente no aparece en astrocitomas anaplásicos y sí en astrocitomas de grado II, lo cual hace pensar que los tres tipos de astrocitomas, según nuestros resultados, se comportan como entidades nítidamente separadas en su histogénesis,

es decir como grupos de tumores primarios, no sujetos a progresión tumoral desde grados II ó III a grado IV.

5) Finalmente, DMBT1 parece tener una participación menor en la génesis de astrocitomas, por lo que, si bien el esfuerzo central de la investigación molecular sobre astrocitomas debe centrarse más en las funciones que ejercen PTEN y p16 como reguladores del ciclo celular, no debemos dejar de lado la posible participación de DMBT1 en un subgrupo de astrocitomas, lo cual podría ser condicionante de su pronóstico o especificidad del tratamiento.

Incidencia de dolor postcolangiopancreatografía retrógrada endoscópica. Análisis de intensidad y factores asociados

M.P. Martín¹, M.J. Iribarren², B. Bermejo³, F.J. Jiménez⁴, J.M. Rodríguez¹, M. Zalba⁵

1. Servicio de Anestesiología, Reanimación y Tratamiento del Dolor. Hospital de Navarra.
2. Departamento de Anestesiología y Reanimación. Clínica Universitaria de Navarra.
3. Servicio de Medicina Preventiva y Gestión de Calidad. Hospital de Navarra.
4. Servicio de Digestivo. Hospital de Navarra.
5. Servicio de Anestesiología, Reanimación y Tratamiento del Dolor. Hospital de Navarra.

Fundamento. El desarrollo de la endoscopia digestiva ha creado una demanda de sedación para el paciente, de modo que la exploración no le resulte desagradable ni dolorosa y se facilite la realización de la técnica al endoscopista, mejorando la calidad asistencial. En nuestro hospital, esta sedación la realiza el anestesiólogo, utilizando como agente anestésico el propofol. Cierta número de pacientes presentan dolor tras la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE), y en algunos casos, éste es el primer aviso de una complicación. Los objetivos del trabajo son:

1. Determinar la incidencia y la intensidad del dolor postCPRE.
2. Determinar qué factores influyen en la aparición de dolor después de la exploración.
3. Determinar la relación entre dolor postCPRE y complicaciones de la técnica.

Material y métodos. Se ha realizado un estudio prospectivo observacional de 143 pacientes a los que se ha realizado CPRE en el Hospital de Navarra desde diciembre de 1999 a febrero de 2002, que cumplieran los criterios de inclusión: sedación con propofol para la CPRE, edad entre 25 y 75 años inclusive, ASA \leq 3 (ASA = clasificación del riesgo anestésico según el estado físico del paciente). Los criterios de exclusión han sido: pacientes con dolor abdominal, náuseas, vómitos, o en tratamiento con analgésicos o antieméticos en las 24 h previas a la CPRE, hipersensibilidad a propofol, cirrosis hepática, embarazadas, pacientes proce-

des de otro hospital y pacientes con enfermedad mental.

Además de las variables demográficas de edad, sexo, ASA, después de la CPRE se han recogido: administración de bromuro de hioscina durante la CPRE, dificultad de canulación de la papila duodenal, técnica endoscópica realizada, diagnóstico endoscópico, duración de la exploración, grado de dolor en escala visual analógica (EVA) de 0 a 10 (0 = sin dolor, 10 = dolor máximo) en sala de reanimación postanestésica (URPA) y en las primeras 24 h postCPRE en planta, y las complicaciones.

Metodología estadística: las variables cuantitativas de distribución normal se han descrito con la media y la desviación estándar. Las variables cualitativas se han descrito con la frecuencia de distribución de las categorías. La comparación de medias se ha realizado mediante t de Student o U de Mann-Whitney según la variable siga o no una distribución normal. La asociación entre variables cualitativas se ha estudiado mediante la Ji cuadrado. El estudio de la correlación entre variables cuantitativas se ha realizado mediante los coeficientes de correlación r de Pearson o de Spearman, según las variables sigan o no una distribución normal. La comparación de medias de dos muestras independientes se ha realizado mediante las pruebas ANOVA o Kruskal-Wallis según sigan o no una distribución normal. El nivel de significación estadística aceptado ha sido del 5% ($p < 0,05$).

Resultados. Se han recogido datos de 143 pacientes: 89 varones y 54 mujeres. La media de edad ha sido

Tabla 1. Incidencia e intensidad de dolor abdominal postCPRE.

| Intensidad del dolor EVA 0-10 | URPA* | | Primeras 24 h** | |
|----------------------------------|-------------|-------|-----------------|-------|
| | Nº casos | % | Nº casos | % |
| 0 | 81 | 56,64 | 68 | 47,55 |
| 1-3 | 21 | 14,69 | 20 | 13,99 |
| 4-6 | 25 | 17,48 | 36 | 25,17 |
| 7-10 | 16 | 11,19 | 19 | 13,29 |
| MEDIA (DE) | 2,05 (2,81) | | 2,65 (3,04) | |

*Incidencia de dolor en la primera hora postCPRE, en URPA.

**Incidencia de dolor en URPA/PLANTA tomando siempre el valor máximo de EVA.

de 61,56 (DE 13,00) años. En cuanto a la clasificación según el riesgo anestésico, encontramos: 19 pacientes (13,29%) ASA 1; 78 pacientes (54,54%) ASA 2; y 46 pacientes (32,17%) ASA 3. La duración media de la exploración ha sido de 36,89 (DE 17,68) minutos.

Dolor abdominal:

- Ningún paciente refirió dolor durante la CPRE.
- La incidencia e intensidad de dolor abdominal postCPRE están descritas en la tabla 1.

En las primeras 24 h, se observó una incidencia de dolor abdominal que precisó tratamiento (EVA \geq 4) en 55 casos (38,46%).

Factores relacionados con el dolor abdominal postCPRE:

- Los pacientes con diagnóstico de colangiocarcinoma presentaron de manera significativa dolor postprocedimiento de mayor intensidad que aquellos con otro diagnóstico ($p = 0,0059$).
- Las asociaciones estadísticamente significativas entre intensidad de dolor abdominal postCPRE y técnica endoscópica como colocación de prótesis pancreática, inyección de contraste en vía biliar o pancreática, y complicaciones como pancreatitis, están expuestas en la tabla 2.
- No se ha encontrado relación significativa entre dolor abdominal y distensión abdominal por gas, esfinterotomía, técnica diagnóstica, extracción de cálculos, prótesis biliar, cambio de prótesis, y retirada de prótesis. Tampoco se ha hallado asociación significativa con la dificultad de canulación de la papila duodenal, ni con la administración de bromuro de hioscina durante la CPRE.

Discusión. En estos pacientes, la incidencia de dolor abdominal en la primera hora (en URPA) es de 43,36%, y en las primeras 24 h después de la CPRE es del 52,45%. Sin embargo, la incidencia de dolor que precisa tratamiento es menor (28,67% en URPA y 38,46% en las primeras 24 h). La incidencia descrita por otros autores es del 36-39%, habiéndose administrado como sedación meperidina y/o diazepam. En nuestro estudio el resultado es similar, un 38,46% en las primeras 24 horas postCPRE, habiéndose realizado la sedación únicamente con propofol, sin asociar analgésicos.

Ningún paciente refirió dolor durante la CPRE. Tradicionalmente, la sedación para endoscopias se ha realizado con benzodiazepinas asociadas o no con analgésico tipo meperidina. El empleo de propofol con efecto amnésico, y la posibilidad de profundizar la sedación en momentos de más dolor o molestia, con una recuperación rápida, podría explicar la ausencia de recuerdo de dolor, a pesar de que el propofol carece de efecto analgésico.

En cuanto a la técnica endoscópica realizada durante la CPRE, únicamente hemos encontrado relación entre la colocación de prótesis pancreática y dolor abdominal postCPRE. Asimismo, la inyección de contraste en conducto biliar o pancreático se asocia a la presencia de dolor tras la exploración. La inervación sensitiva llega a la vía biliar por el plexo hepático, y la vía eferente llega a la médula a través de los nervios espláncnicos, al igual que las fibras dolorosas del páncreas. Las vías biliares duelen por distensión o por espasmo. Una de las causas del dolor abdominal postCPRE podría ser la manipulación de los conductos biliar y pancreático, ya que la intervención únicamente sobre la papila duodenal no se relaciona de forma significativa con dolor postCPRE.

Es bien conocida la asociación entre dolor postCPRE y pancreatitis como complicación de la técnica. Hemos encontrado diferencias significativas entre la intensidad del dolor relacionado con pancreatitis (media 5,39, DE 2,89), y el dolor no relacionado con pancreatitis (media 2,47, DE 2,97). Estos datos coinciden con los ya descritos asociando la presencia de dolor severo postCPRE con complicación grave como pancreatitis o perforación.

El colangiocarcinoma se ha asociado con más dolor tras el procedimiento que otros diagnósticos. Este es un tumor propio de la vía biliar, por lo que la manipulación de dicha vía sería más complicada, más dificultosa, y motivo de dolor. Por otra parte, la estenosis causada por el propio tumor suele ocasionar una dilatación de las vías biliares proximales al tumor, que por sí misma también ocasiona dolor.

Tabla 2. Factores relacionados con la intensidad de dolor abdominal postCPRE.

| | Intensidad de dolor en URPA | | Intensidad de dolor en las primeras 24 h. | |
|---|-----------------------------|--------|---|--------|
| | Media (DE) | p* | Media (DE) | p* |
| Colocación de prótesis pancreática | | | | |
| -sí | 4,87 (3,52) | 0,0107 | 5,00 (3,70) | 0,0452 |
| -no | 1,88 (2,68) | | 2,51 (2,95) | |
| Técnica incompleta, biopsia de papila duodenal | | | | |
| -sí | 0,86 (2,44) | 0,0071 | 1,23 (2,58) | 0,0070 |
| -no | 2,26 (2,82) | | 2,90 (3,05) | |
| Inyección de contraste en vía biliar | | | | |
| -sí | 2,25 (2,84) | 0,0149 | 2,92 (3,04) | 0,0058 |
| -no | 0,90 (2,36) | | 1,15 (2,62) | |
| Inyección de contraste en vía pancreática | | | | |
| -sí | 2,84 (3,32) | 0,0338 | 3,50 (3,39) | 0,0214 |
| -no | 1,60 (2,36) | | 2,17 (2,72) | |
| Pancreatitis | | | | |
| -sí | 4,00 (3,00) | 0,0225 | 5,39 (2,89) | 0,0057 |
| -no | 1,92 (2,76) | | 2,47 (2,97) | |

*Nivel de significación (valor de la p) en la comparación de medias.

Análisis tridimensional del reflejo vestibulo-oculomotor calórico y rotatorio en población normal y efectos del envejecimiento

N. Pérez

Departamento de Otorrinolaringología. Clínica Universitaria de Navarra.

FUNDAMENTO

El estudio de la función vestibular se ha realizado tradicionalmente por medio de la valoración del reflejo vestibulo-oculomotor (RVO) evocado por la estimulación calórica y rotatoria. En ambos casos el efecto resultante es un nistagmus cuyas características de dirección, velocidad y duración son congruentes con la estimulación de los canales semicirculares. En la actualidad la Videonistagmografía (VNG) mediante un sistema de cámara especial y un programa concreto de análisis de imagen, permite determinar con exactitud los componentes torsional, horizontal y vertical. El objetivo de este estudio es analizar los tres componentes del nistagmus, así como precisar la estimulación más precisa para la estimulación calórica y rotatoria de cada canal semicircular en la prueba calórica convencional y con estímulo máximo (0°C).

MATERIAL Y MÉTODOS

Ámbito y sujetos de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Exploración Vestibular en el Clínica Universitaria de Navarra. Se incluyeron 60 sujetos sin antecedentes de patología auditiva ni vestibular así como sin tratamiento farmacológico alguno. La edad media fue 43±13 años (20-80), 33 mujeres y 27 varones. Todos firmaron el correspondiente consentimiento informado.

Diseño del estudio. Variables. Instrumentos de medida

1. Análisis del componente horizontal, vertical y torsional del nistagmus resultante de la estimulación vestibular con preferencia del CSH. La prueba calórica se hace con agua a 0°C, 30°C y 44°C con el paciente en decúbito supino y decúbito prono. La prueba rotatoria consiste en una estimulación sinusoidal (0,32 Hz) con velocidad máxima en cada semiperíodo de 200°/s. Se estudiará la constante de tiempo del nistagmus inducido.

2. Determinación de la posición óptima de estímulo calórico de los canales semicirculares superior y posterior. Se estudiaron 8 posiciones de acuerdo con las posibles por la disposición de los canales semicirculares vertical y posterior. La estimulación calórica fue sólo con agua a 0°C.

3. Análisis del componente horizontal, vertical y torsional del nistagmus resultante de la estimulación vestibular calórica y rotatoria con preferencia del CSS y CSP.

La respuesta a la estimulación calórica se estudió con un equipo especial de análisis de la motilidad ocular en los tres ejes del espacio (*Frenzel video lunettes*) Videonystagmograph ULMER. Versión 1.4. SYNOPSIS. MARSEILLE. La prueba rotatoria se realizó con el equipo CHARTR-ICS Medical Corp, Shaumburg Ill.

RESULTADOS

En la tabla 1 aparecen los valores promedio de la velocidad de fase lenta de cada componente del nistagmus inducido por la estimulación del oído derecho. Con las estimulaciones a 0°C y 30°C el nistagmus fue horario (horizontal derecho, vertical hacia arriba y torsional horario) mientras que con la estimulación a 44°C la dirección fue opuesta en el componente horizontal y torsional sólo. El resultado de la prueba rotatoria se muestra en la figura 1 pudiendo analizar sólo el resultado de la componente horizontal del nistagmus debido a que los componentes vertical y posterior estaban extremadamente artefactados.

En la figura 2, se presenta el valor de cada componente del nistagmus de acuerdo a la posición de la cabeza durante la estimulación. Las posiciones con la cabeza inclinada incluyen además un giro de 25° aproximadamente.

Tabla 1. Valor promedio y desvío estándar del nistagmus, en °s-1, inducido por las correspondientes estimulaciones con agua a diferentes temperaturas en el oído derecho con el sujeto en decúbito supino y la cabeza sobre-elevada 30° respecto a la horizontal así como en decúbito prono.

| Componente | Edad | Supino | | | Prono | | |
|------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0°C | 30°C | 44°C | 0°C | 30°C | 44°C |
| Horizontal | 20-30 | 35±1,3 | 19±2,7 | 21±1,2 | 33±1,6 | 22±1,7 | 13±1,7 |
| | 31-40 | 36±1,9 | 20±2,9 | 23±3,1 | 35±1,4 | 22±3,5 | 14±1,9 |
| | 41-50 | 35±3,3 | 21±3,6 | 22±3 | 37±3 | 21±2,5 | 15±3,4 |
| | 51-60 | 30±4,8 | 17±3,1 | 20±4,4 | 28±5,8 | 22±4,3 | 14±4,7 |
| | 61-70 | 26±6,3 | 10±7,9 | 15±6,4 | 19±6,4 | 19±6,9 | 9±6,7 |
| | 71-80 | 26±7,2 | 11±8,4 | 13±5,2 | 22±3,2 | 15±5,9 | 8±8,3 |
| Vertical | 20-30 | 30±3,6 | 13±2,7 | 16±1,2 | 28±1,6 | 17±1,7 | 8±1,7 |
| | 31-40 | 30±4,9 | 15±4,4 | 18±3,1 | 30±1,4 | 17±3,8 | 9±1,9 |
| | 41-50 | 27±3,4 | 13±3,6 | 17±3 | 30±3,2 | 16±2,5 | 10±3,4 |
| | 51-60 | 23±4,8 | 12±3,1 | 13±4,2 | 20±5,8 | 17±4,3 | 9±5,7 |
| | 61-70 | 18±6,3 | 6±7,5 | 10±6,4 | 14±7,4 | 12±8,9 | 8±6,7 |
| | 71-80 | 19±7,2 | 5±8,4 | 8±5,2 | 17±3,2 | 10±6,9 | 6±7,3 |
| Torsional | 20-30 | 25±2,1 | 9±2,2 | 11±2,2 | 23±1,3 | 12±0,7 | 3±0,7 |
| | 31-40 | 26±1,9 | 10±2,4 | 13±2,1 | 25±1,4 | 12±0,5 | 4±1 |
| | 41-50 | 25±3,3 | 11±6,6 | 10±3,3 | 27±3 | 11±3,2 | 5±1,4 |
| | 51-60 | 20±5,8 | 7±1,1 | 10±1,4 | 18±3,8 | 12±1,3 | 4±1,2 |
| | 61-70 | 16±6,3 | 4±0,9 | 5±3,4 | 9±3,4 | 9±2,9 | 3±2,7 |
| | 71-80 | 16±7,2 | 6±8,4 | 3±5,4 | 12±2,2 | 5±3,9 | 2±0,3 |

DISCUSIÓN

Desde los primeros trabajos sobre la motilidad ocular realizados en el siglo XIX era evidente la necesidad de considerar los tres ejes principales de rotación para llevar a cabo un estudio cuantitativo correcto (Donders, Helmholtz, Herring) pero no es hasta finales del XX cuando la técnica lo permite, primero con la bobina escleral en campo magnético de Robinson (*scleral search coil*, SSC) que es el sistema adecuado y patrón de referencia para el resto y, luego la VOG. En el movimiento ocular es fundamental considerar que las rotaciones no son conmutativas y se debe definir la posición angular como resultado de una o varias rotaciones en un marco concreto de referencia. Este marco de referencia no es fácil de definir y está sujeto a numerosas variables.

La prueba calórica representa una de las formas de estudio de la función vestibular más aceptadas y

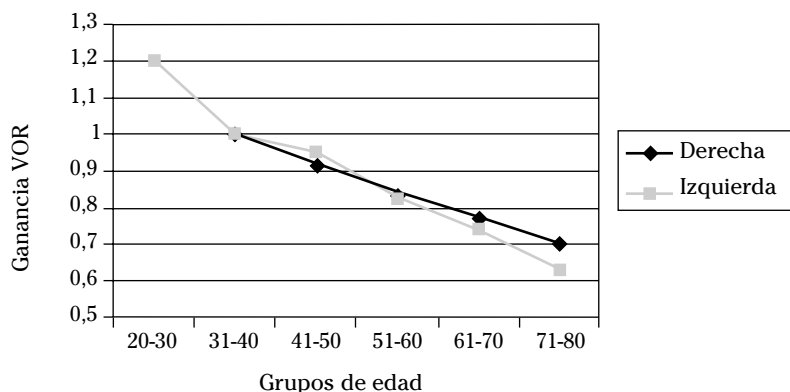


Figura 1. Valor de la ganancia del VOR con giros hacia derecha e izquierda.

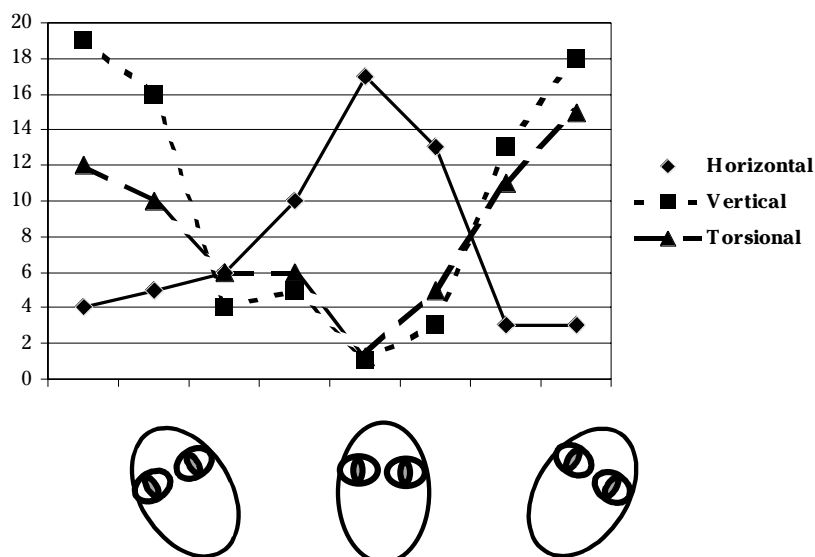


Figura 2. Valor ($^{\circ}$ s-1) de cada uno de los componentes del nistagmus de acuerdo a la posición de la cabeza durante la estimulación rotatoria impulsiva.

cuyo valor localizador en el diagnóstico queda fuera de toda duda. El nistagmus evocado parece originarse fundamentalmente del estímulo del canal semicircular horizontal aunque no parece ser ajeno a este nistagmus la estimulación del superior o incluso del posterior también como se aprecia en los resultados obtenidos por la estimulación máxima en el primer estudio. Se observa que el nistagmus inducido en la prueba calórica se puede descomponer en los tres elementos fundamentales: horizontal, vertical y torsional. Cuando se estudian los tres componentes del nistagmus, si se utiliza un estímulo intenso en un oído como puede ser el agua helada, el componente horizontal es habitualmente el esperado con una fase rápida hacia el lado contrario. El componente vertical es variable, si la estimulación predomina en el canal superior el nistagmus es vertical hacia arriba y si es el posterior, vertical hacia abajo; si ambos contribuyen igualmente, se cancela dicho componente vertical y predomina el torsional. Este último es horario (desde el punto de vista del explorador) si la estimulación es del oído derecho y, antihorario si es el izquierdo.

Estamos considerando evidentemente la actividad inhibitora en los tres canales que provoca el estímulo con agua helada: corriente ampulífuga en el

CSH y ampulípeto en los verticales. Al cambiar la posición del sujeto (de decúbito supino a decúbito prono) los componentes horizontal y torsional cambian congruentemente de sentido pero no así el vertical probablemente porque el componente no-convectorio del nistagmus es más importante. Los valores del nistagmus obtenido siguen siendo importantes y la sensación que el paciente refiere (vértigo, mareo) es intensa.

Cuando consideramos la irrigación de ambos oídos con el objeto de replicar el trabajo de Jongkees, se encuentra que el componente vertical no es dependiente del lado de irrigación pero sí de la posición cefálica. El componente torsional se comporta de manera contraria, esto es, depende más del lado de estimulación. El vector resultante de la estimulación del oído derecho e izquierdo es de idéntica magnitud pero de sentido contrario y, el de los canales verticales posee una mezcla variada de componente vertical y torsional pues son modulados por la posición cefálica pero no de acuerdo a una función coseno del ángulo formado por el plano del canal y el vector de gravedad. Los valores de constante de tiempo suponen una referencia de la normalidad con la que deberemos comparar futuros estudios en pacientes con patología vestibular.

Investigación y desarrollo clínico de estrategias encaminadas al tratamiento de pacientes con cáncer mediante la inyección intratumoral de células dendríticas ingenierizadas para producir Interleukina-12

M. Rodríguez-Calvillo, C. Alfaro, G. Mazzolini, B. Sangro, J. Prieto, I. Melero

Centro de investigación Médica Aplicada (CIMA), Departamento de Medicina Interna y Área de Terapia Celular de la Clínica Universitaria. Universidad de Navarra.

Introducción. La inmunoterapia celular activa del cáncer con células dendríticas es un campo extraordinariamente activo de investigación preclínica y clínica por sus resultados prometedores en enfermedades para las que carecemos de tratamientos eficaces. Nosotros hemos demostrado que la inyección intratumoral de células dendríticas induce potentes efectos terapéuticos frente a tumores experimentales murinos si estas células han sido previamente transfectadas para expresar los genes de la Interleukina-12 mediante adenovirus recombinantes. Otro grupo ha reportado resultados similares. En cambio, la inyección de células dendríticas no transfectadas carece de efecto antitumoral frente a nódulos tumorales bien establecidos si bien parece que tiene eficacia frente a micrometástasis.

Resultados y Discusión. Hemos realizado experimentos preclínicos en modelos murinos que han documentado la eficacia y seguridad de este procedimiento, lo que ha permitido la autorización por el Comité Ético de investigación clínica de Navarra y la Agencia Española del Medicamento de un ensayo clínico basado en este procedimiento. El ensayo clínico incluye 15 pacientes con neoplasias avanzadas de origen gastrointestinal (cáncer de colon, páncreas y carcinoma hepatocelular). Las células dendríticas se obtienen mediante diferenciación inducida por Interleukina-4 y GM-CSF en cultivo de monocitos purificados por inmunoselección magnética (sistema clínico de purificación de células CD14⁺ de Miltenyi-Clinimacs). Una vez diferenciadas las células dendríticas (>98% CD11c⁺) son transfectadas *in vitro* con el vector adenoviral AF-IL12 (adenovirus recombinante defectivo que codifica para las cadenas de la Interleukina-12 separadas por un sitio interno de entrada de ribosoma bajo el control transcripcional del promotor de CMV). Este agente es el producto en fase de investigación (PEI) que también fue aprobado por la Agencia Española del Medicamento. Las instalaciones en el área de terapia celular de la clínica

universitaria han sido aprobadas por las autoridades forales y nacionales de medio ambiente para la liberación controlada de dicho agente.

Hemos demostrado que el efecto terapéutico se basa en que las células dendríticas entran en el tejido maligno al ser inyectadas y captan por diferentes mecanismos antígenos procedentes de las células tumorales. Hemos observado que tras un breve plazo de residencia en el tumor las células dendríticas migran activamente a los órganos linfoides secundarios a los que el tejido drena transportando estos antígenos. Una vez allí sabemos que presentan antígenos tumorales a linfocitos T y que la producción local de Interleukina-12 es necesaria para inducir la respuesta inmunitaria antitumoral efectiva. Mediante experimentos de deplección hemos aprendido que la respuesta es llevada a cabo por linfocitos T citotóxicos y que una producción temprana y antígeno-inespecífica de Interferon- γ por parte de células NK y linfocitos T helper interpreta un papel fundamental. Hemos observado que la expresión en las células dendríticas de moléculas presentadoras de antígeno del MHC autólogas es absolutamente necesaria. Aunque aún no sabemos si tiene algún papel en inmunoterapia hemos observado que la infección de células dendríticas con adenovirus recombinantes defectivos de modo independiente del transgen determina cambios madurativos en la célula dendrítica.

A modo de resumen en la figura 1 se recoge un esquema de la estrategia terapéutica propuesta y de los mecanismos implicados.

Perspectivas. En los próximos meses conoceremos el perfil de seguridad y eficacia en humanos de la estrategia terapéutica desarrollada. Estamos desarrollando en investigación preclínica estrategias combinadas de tratamiento inmunoterápico que aumentan la eficacia de estos procedimientos.

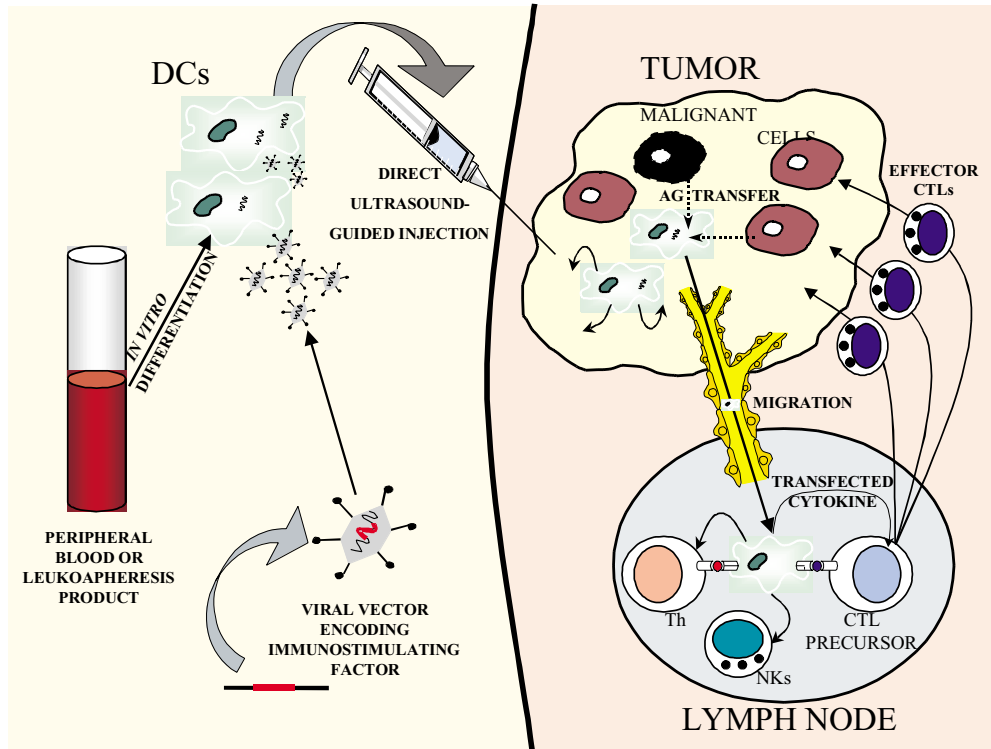


Figura 1. Representación esquemática de la estrategia de tratamiento de inmunoterapia génica desarrollada.

Seguimiento Universidad de Navarra

Fundamento. Muchos estudios prospectivos han valorado la relación entre ciertos nutrientes y la incidencia de diversas enfermedades crónicas. Sin embargo, muy pocos han relacionado un patrón dietético en su conjunto con el riesgo de estos trastornos.

La dieta mediterránea es un ejemplo de patrón dietético seguido en países cuyas tasas de mortalidad por cardiopatía isquémica son de las más bajas del mundo. Sin embargo, la dieta mediterránea no ha sido estudiada como tal patrón en cuanto a su relación con la incidencia de enfermedades concretas.

El Proyecto SUN es un estudio de cohortes basado en universitarios que pretende identificar los nutrientes específicos de la dieta mediterránea responsables del aducido papel protector de la misma. Para ello, es necesario, en primer lugar, establecer si el patrón de dieta mediterránea es seguido en esta cohorte. En segundo lugar, conocer, cuantificar y controlar los posibles factores de confusión que pudieran introducir un sesgo en la determinación de la asociación causal, dieta-enfermedad.

Material y métodos. El diseño de investigación es un estudio prospectivo basado en cuestionarios enviados por correo cada dos años a antiguos alumnos universitarios. Se ha precedido de un estudio preliminar de casos y controles de dieta e infarto de miocardio.

El cuestionario está compuesto de dos partes, la primera sobre estilos de vida y la segunda sobre hábitos alimentarios. El cuestionario semicuantitativo de frecuencia de alimentos fue desarrollado por el Departamento de Nutrición de la *Harvard School of Public Health* y ha sido validado en España.

Reclutamiento de los participantes. Hasta la fecha se ha enviado la invitación a participar en la cohorte a 60.000 graduados. También se ha extendido la invitación a participar en el proyecto al Colegio de Enfermería de Navarra y a los socios de la entidad aseguradora (ACUNSA).

Procesamiento de los cuestionarios y creación de base de datos. La lectura de los cuestionarios se realiza a través de un máquina de lectura óptica que fue pro-

gramada para leer directamente los cuestionarios y transferir sus datos a una base de datos del programa estadístico SPSS.

Estudio preliminar. Como análisis preliminar se llevó a cabo un estudio de casos y controles que valoró la relación entre la dieta mediterránea y el infarto agudo de miocardio. Los datos dietéticos se recogieron con el cuestionario semi-cuantitativo de frecuencia de consumo ya usado para el estudio de cohortes. Las asociaciones se valoraron mediante análisis multivariantes de regresión logística condicional.

Análisis. El patrón de dieta mediterránea fue definido *a priori*. Además, se identificaron otros patrones dietéticos de forma empírica mediante un análisis de componentes principales. En el estudio de casos y controles se analizaron las relaciones entre los efectos de interés y algunas exposiciones (puntuación global de dieta mediterránea y de patrones identificados empíricamente, consumo de fruta como postre, aceite de oliva, ácidos grasos omega-3, fibra total, fibra de frutas, alcohol, vino tinto y carga glucémica).

Resultados

Resultados obtenidos en el estudio de casos y controles. El consumo de aceite de oliva (distribuido en quintiles de consumo) se asoció de forma inversa con el riesgo de IAM.

Se encontraron también asociaciones inversas con el IAM para los tres quintiles superiores de ingesta de fibra.

En el presente estudio se encontró un efecto beneficioso de la ingesta de ácidos grasos omega-3, con una reducción del riesgo de un primer IAM en los dos terciles superiores. La reducción relativa del riesgo fue aproximadamente del 55% para los dos terciles superiores.

Resultados obtenidos en el análisis transversal de los datos del estudio de cohortes. La base de datos del proyecto SUN incorporó hasta noviembre de 2001 a 7.508 participantes. Se han analizado hasta la fecha los datos de los 4.259 primeros participantes.

Entre estos participantes, se han determinado los factores asociados al seguimiento de un patrón de dieta mediterránea definido *a priori* y al seguimiento de dos patrones dietéticos obtenidos de forma empírica mediante análisis de componentes principales (análisis factorial).

Un examen atento de estos dos patrones de dieta encontrados por el análisis factorial permite equipararlos a un patrón de dieta "americanizada" (Patrón 1) y una versión mediterránea del patrón de dieta prudente (Patrón 2) descrito por Hu y col. En el primer patrón puntuaron positivamente: la comida rápida (hamburguesas, salchichas y pizza), patatas fritas, productos lácteos enteros, comida precocinada, carnes rojas, salsas (mayonesa, tomate frito, ketchup), embutidos, repostería industrial y huevos. De forma negativa lo hicieron el pan integral y los productos lácteos desnatados y semi-desnatados. Por el contrario, en el patrón 2 se ponderaban positivamente sobre todo los consumos de verduras, pescados, frutas, carne de ave, aceite de oliva, legumbres y frutos secos. Pudo comprobarse cómo el primer patrón asignaba coeficientes de signo positivo a aquellos alimentos que van más en contra de las reco-

mendaciones dietéticas y que mejor se identifican con las comidas rápidas o con lo que se ha dado en llamar "comida basura". Contrariamente, los alimentos ponderados positivamente en el segundo patrón son mayoritariamente elementos característicos de lo que tradicionalmente se ha considerado la dieta mediterránea.

En el caso del patrón mediterráneo definido *a priori*, tanto en hombres como en mujeres, la edad y el número de METs-horas/semana dedicados al ejercicio físico fueron las variables que más se relacionaron con la adhesión al patrón. Ambas asociaciones fueron positivas. La siesta sólo se asoció de forma significativa con una mayor adhesión al patrón Mediterráneo entre los varones de la muestra. Las mujeres presentaron un porcentaje relativo de adhesión al patrón un 4,1% (IC 3,2 a 4,9) superior a los hombres.

Los factores asociados al seguimiento de un patrón de dieta "americanizada" fueron entre los varones, una mayor edad, el diagnóstico previo de hipercolesterolemia, un menor índice de masa corporal y una menor exposición a la siesta. Entre las mujeres, la edad no se asoció con el seguimiento de un patrón "americanizado". Se observaron asociaciones negativas para el número de horas semanales dedicadas a ver la televisión, el índice de masa corporal, la realización de actividad física durante el tiempo libre y el diagnóstico previo de hipercolesterolemia. Cuando se analizó la relación del sexo con el seguimiento del patrón "americanizado", se halló una mayor adhesión entre los hombres que entre las mujeres. El porcentaje de adhesión fue un 9,1% (IC 95%: 7,8 a 10,4) mayor en hombres que en mujeres.

Los factores asociados al seguimiento de patrón de tipo mediterráneo identificado *a posteriori* fueron la edad y la actividad física durante el tiempo libre, que se asociaron de forma positiva y estadísticamente significativa en el caso de los varones. En el caso de las mujeres, fueron la edad y el índice de masa corporal los factores asociados de forma positiva al seguimiento de este tipo de dieta. En el análisis conjunto de la muestra, las mujeres se adherían mejor a este patrón. Su porcentaje relativo de adhesión fue un 3,6% superior que en el caso de los hombres y de forma muy significativa (IC 95%: 2,6 a 4,6).

Conclusión. Los resultados del estudio de casos y controles muestran evidencias respecto a la protección que puede ofrecer el aceite de oliva frente a la enfermedad coronaria. Destaca que los cereales (sobre todo pan blanco) más frecuentemente consumidos en España no resultan protectores.

Los primeros resultados transversales de la cohorte indican la existencia de dos patrones dietéticos. Uno de ellos consistió en un patrón dietético importado de EEUU y seguido principalmente por jóvenes. El segundo correspondió a un patrón de dieta mediterránea y cuyo seguimiento aumentó con la edad y con el incremento de la realización de actividad física durante el tiempo libre.

Este hallazgo puede interpretarse como una comprobación empírica de que la tradicional dieta mediterránea sigue vigente en la población española, aunque los resultados hallados nos indicaron la existencia de un alejamiento del patrón de dieta mediterránea, considerada como un patrón de dieta saludable, entre los participantes más jóvenes.

Vectores poliméricos para la administración de itraconazol: preparación, caracterización y actividad antifúngica

S. Espuelas¹, M.A. Suescun¹, M.A. Campanero², M. Rubio³, J.M. Irache¹

1. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Clínica Universitaria de Navarra.
2. Farmacología Clínica. Clínica Universitaria de Navarra.
3. Microbiología. Clínica Universitaria de Navarra.

Fundamento. Las infecciones fúngicas sistémicas han aumentado de forma alarmante en los últimos años, paralelamente a los enfermos inmunocomprometidos. La nefrotoxicidad que ocasiona la anfotericina B, normalmente tratamiento antifúngico de primera elección, ha incrementado el uso de los azoles en la práctica clínica. Esto ha llevado a la creciente aparición de cepas resistentes a esta familia de fármacos. La sobreexpresión de proteínas transmembrana ATP-dependientes parece ser uno de los mecanismos implicados en la resistencia, al expulsar el fármaco del interior de la célula fúngica, e impedirle alcanzar su enzima target intracelular. Entre los azoles, el itraconazol presenta un espectro de acción amplio y una actividad fungistática a valores muy inferiores a los del fluconazol. Su administración intravenosa hasta hace poco había sido imposible por su alta insolubilidad en agua. Recientemente, se ha comercializado una solubilización con ciclodextrinas para este fin. Otra estrategia podría ser el uso de vectores coloidales en el rango de nanómetros, como nanocápsulas. Además, su captura pasiva por las células del sistema MPS permitiría acumular el itraconazol en los macrófagos junto con los hongos, disminuyendo la dosis necesaria a ser administrada y con ello el riesgo de aparición de resistencias.

El presente trabajo describe la preparación y caracterización de nanopartículas para el itraconazol. La coencapsulación de agentes descritos como bloqueantes de las proteínas de extrusión P-gp (poloxamers y flavonoides) ha sido también estudiada. Su eficacia fungistática es evaluada en macrófagos infectados con dos tipos de cepas de *Candida spp.*, una sensible y otra resistente a los azoles.

Material y métodos

Preparación de las nanopartículas. Las nanocápsulas se prepararon por inyección coaxial turbulenta (patente propia). Este procedimiento está basado en la inyección turbulenta de dos fases miscibles en una celda de reacción. La primera fase o fase orgánica está compuesta por una disolución orgánica del polímero (poli-ε-caprolactona o PLGA 502), el fármaco itraconazol (ITRA), Imwitor 78K como vehículo oleoso formador del núcleo de la nanocápsula y, eventualmente, el componente que debe bloquear las proteínas de extrusión (quercetina o kaemferol). La fase acuosa está formada por una disolución acuosa de poloxamer 188 (0,5% p/v). La mezcla de las dos fases induce la formación de nanocápsulas. La suspensión se concentró en rotavapor y, finalmente, se liofilizó utilizando sacarosa como crioprotector.

Caracterización físico-química de las formulaciones.

El tamaño medio de los distintos lotes fue medido por espectroscopía de correlación fotónica (PCS) en un Zetamaster (Malvern Instruments). El análisis morfológico se realizó por SEM (DSM 940 A, Zeiss, Germany). El análisis de las características superficiales (potencial zeta) se realizó tras la dispersión en agua p.i. de las formulaciones y su posterior análisis en el Zetamaster (Malvern Inst.). La cantidad de fármaco asociado a las nanopartículas se determinó mediante separación por HPLC y posterior detección por fluorescencia.

Cinética de liberación. Aproximadamente 75 mg de cada muestra de nanocápsulas se introdujeron en un sistema de diálisis, incubándose en 200 ml de una solución acuosa de albúmina sérica humana al 10% (Albúmina Grifols al 20%). El conjunto se sometió a agitación y a una temperatura de 37°C controlada mediante baño termostático. A intervalos de tiempo determinados, 1 ml de muestra se retiraba, diluyéndose con 0,5 ml de acetonitrilo para precipitar las proteínas, y las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min. Alicuotas de los sobrenadantes fueron directamente inyectados en el sistema cromatográfico.

Evaluación biológica: Actividad frente a *Candida spp. intracelular en macrófagos J774.2.* Macrófagos de la línea celular J774.2 (peritoneales de ratón) mantenidos en medio DMEM suplementado con 10% FBS fueron repartidos en placas de 24 pocillos a una concentración de 4×10^5 células/pocillo. Tras esperar 2 h a su fijación fueron expuestos durante 30 min con *Candida albicans* a una concentración levadura:macrófago 3:4 para su infección. *Candida albicans* había sido previamente opsonizada con suero fresco de ratón (para facilitar su fagocitosis). Después de este tiempo, 2×10^5 levaduras ya han sido fagocitadas, y las extracelulares fueron eliminadas lavando 3 veces con el medio DMEM. Entonces, los macrófagos fueron sometidos a los distintos tratamientos (fluconazol, itraconazol y sus formulaciones) e incubados con ellas durante 18 h. Después de este tiempo, se rompieron los macrófagos con Triton X-100 (2%) para liberar las levaduras intracelulares que sobrevivieron a los tratamientos, y se efectuó su recuento tras la correspondiente dilución y subcultivo en placas de TSA. También se determinó la cantidad de itraconazol (libre o encapsulado) internalizado por estos macrófagos infectados utilizando el método de HPLC previamente descrito para este fármaco. Este experimento fue realizado con la cepa control azol-sensible WT (ATCC) y con una cepa azol-resistente (AZ-R D54 296), aislamiento clínico proporcionado por la Dr. Sanglard (Hospital Universitario, Lausanne, Suiza).

Resultados y Discusión. El uso indiscriminado de antibióticos y antifúngicos ha hecho aumentar de forma alarmante en los últimos años la aparición de cepas resistentes. El diseño de estrategias que mejoren la respuesta de los microorganismos a los tratamientos clásicos, que frenen la aparición de cepas resistentes, junto con una política de uso racional, se plantean como una necesidad urgente. En particular, la proliferación masiva de infecciones fúngicas paralelas a los enfermos inmunocomprometidos ha extendido el uso de los antifúngicos azoles y con ello la aparición de especies de *Candida spp.* azol resistentes. La sobreexpresión de proteínas de membrana ATP-dependientes parece ser una causa importante de la resistencia inducida a los azoles.

La asociación de estos fármacos con vectores de naturaleza polimérica, nanopartículas o nanocápsulas podría representar una alternativa interesante. Al ser estos vectores rápidamente capturados por los macrófagos, podrían posibilitar su acumulación preferencial en los órganos ricos en células del sistema monocito-

macrofágico, lugar también principal de acumulación de los patógenos. Esto permitiría la administración de dosis más bajas, disminuyendo con ello el riesgo de aparición de resistencias. Además, el itraconazol es un antifúngico altamente insoluble, y su vectorización permitiría el diseño de una preparación para su administración por vía intravenosa, alternativa al actual tratamiento oral, con una absorción errática.

Mediante el procedimiento de inyección coaxial turbulenta, el itraconazol fue eficazmente encapsulado (superior al 80%) (Tabla 1) en vectores nanoscópicos elaborados con polímeros tipo poliéster (poli-ε-caprolactona o copolímeros del ácido láctico y glicólico) con un núcleo oleoso en el interior (nanocápsulas). Las formulaciones fueron homogéneas y monodispersas, con un tamaño medio de 250 nm y carga superficial negativa en torno a -35 mV. La coencapsulación de agentes descritos como bloqueantes activos de las proteínas de extrusión, como quercetina o kaempferol, no afectó a sus características físico-químicas, ni a la eficacia de encapsulación del itraconazol (Tabla 1).

Tabla 1. Características físico-químicas de las formulaciones conteniendo agentes bloqueantes de las proteínas de extrusión (quercetina o kaempferol). Los datos expresan media±s.d. (n = 3-6). Condiciones experimentales: ITRA/polímero = 0,066; polifenol/PEC = 0,066; polifenol/PLGA502 = 0,033; Q = quercetina; K = kaempferol; PEC = poli(ε-caprolactona); PLGA: copolímero del ácido láctico y glicólico 50:50 (peso molecular de 14 kDa; comercializado como Resomer R502).

| Formulación | Tamaño (nm) | Polidispersión | Potencial Zeta (mV) | Contenido (mg/mg) | E.E. (%) |
|-------------|-------------|----------------|---------------------|-------------------|----------|
| PEC | 244±4 | 0,056±0,031 | -32,7±1,1 | 64,96±0,30 | 97,48 |
| PEC-Q | 240±3 | 0,067±0,006 | -34,2±0,8 | 69,55±2,07 | 98,01 |
| PEC-K | 248±5 | 0,056±0,029 | -44,3±0,4 | 60,75±1,11 | 91,13 |
| PLGA | 182±5 | 0,037±0,015 | -39,3±1,0 | 63,15±0,64 | 94,73 |
| PLGA-Q | 198±1 | 0,036±0,004 | -34,2±0,3 | 61,02±3,01 | 96,05 |
| PLGA-K | 209±3 | 0,048±0,005 | -42,9±0,5 | 58,37±1,04 | 87,56 |

A pesar de que algunas de estas formulaciones aumentaron la cantidad de itraconazol capturada por los macrófagos, y por tanto, susceptible de estar cerca de la levadura fagocitada en su interior (datos no mostrados), la actividad fungistática del itraconazol no se vió mejorada, permaneciendo inalterada en el caso de la cepa de *Candida spp.* azol-sensible (WT), e incluso disminuida en el caso de la cepa azol-resistente (D54 296) (Fig. 1). Una liberación demasiado lenta del itraconazol desde el interior de las nanocápsulas, la mayor capacidad de invasión y proliferación encontrada para las cepas azol-resistentes en cultivos de macrófagos J774.2, y la ausencia de actividad de

los agentes coencapsulados en las proteínas de extrusión específicas de *Candida spp.* podrían explicar estos resultados.

Por otro lado, aunque la vectorización de antibióticos disminuye generalmente su actividad en modelos de infección *in vitro*, los resultados han sido mucho más satisfactorios *in vivo*, en modelos animales. Ante la falta de correlación *in vitro-in vivo*, experimentos en modelos de infección fúngica animal están siendo actualmente realizados para evaluar el verdadera potencial de nuestros sistemas y de la estrategia propuesta en el presente trabajo experimental.

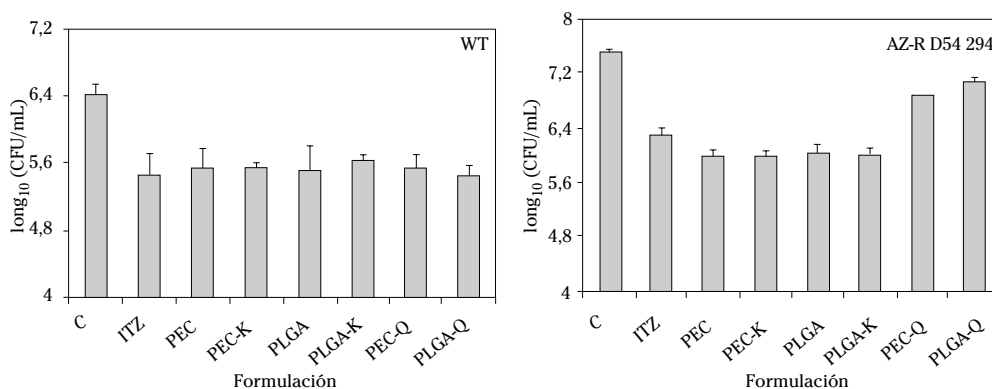


Figura 1. Eficacia antifúngica de las distintas nanocápsulas de itraconazol frente a *Candida* spp. azol-sensible (WT) y una cepa azol-resistente (D54 296) intracelular en macrófagos J774.2 tras 18 h de incubación. Ratio de infección macrófago:levadura 2:1. Concentración de itraconazol de 1 mg/mL vs células.

Caracterización de marcadores bioquímicos y genéticos de densidad mineral ósea en pacientes pediátricos con tumores óseos

E. Ruza, C. Azcona, A. Patiño

Laboratorio de Pediatría, Unidad de Oncología Pediátrica, Departamento de Pediatría, Clínica Universitaria de Navarra, Universidad de Navarra, Pamplona.

INTRODUCCIÓN

La relación entre talla alta, aceleración del crecimiento y desarrollo de tumores óseos durante la infancia y adolescencia, continúa siendo una hipótesis controvertida en la actualidad. Dado que los factores genéticos contribuyen en gran medida a la regulación del crecimiento, durante estos últimos años se han estudiado posibles asociaciones entre los genes implicados en el metabolismo óseo y diferentes parámetros de crecimiento.

Los niños afectados de tumores óseos presentan múltiples factores de riesgo de presentar una menor densidad mineral ósea (DMO), no sólo como consecuencia de la propia enfermedad, sino también por los tratamientos recibidos y sus efectos sobre el metabolismo óseo. Por otra parte, estos mismos genes parecen estar implicados en la adquisición de la masa ósea durante la infancia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 72 pacientes afectados de osteosarcoma (OS) y 53 de sarcoma de Ewing (SE) pertenecientes a la Unidad de Oncología del Departamento de

Pediatría de la Clínica Universitaria de Navarra, con edades medias de 14,1 (4,01) y 13,3 (4,3) años, respectivamente. El proyecto de investigación fue aprobado por la Comisión de Docencia e Investigación Clínica de la Clínica Universitaria, previa obtención del consentimiento informado de los pacientes.

Se recogieron los valores de talla y peso al diagnóstico de 58 pacientes afectados de OS y de 36 de SE y se expresaron como SDS (*Standard Deviation Scores*). El desarrollo puberal, valorado según Tanner, era acorde a la edad cronológica en todos los pacientes.

La DMO se determinó en 38 pacientes con OS y 26 con SE en remisión clínica. La medición se realizó al nivel de columna lumbar (L2-L4) mediante DEXA (*Dual-Energy-X ray Absortometry*), utilizando un densitómetro Hologic QDR 4500W versión 9.8 Elite (Hologic, Woltham, MA). Los valores se equipararon a Lunar (Madison, WI, EE.UU.) y se expresaron como SDS.

Se obtuvieron 75 muestras de suero de 59 OS y 48 de 36 SE y se agruparon los pacientes según poseyeran enfermedad tumoral o se encontrasen en remisión clínica. Se determinaron marcadores bioquímicos de: formación ósea, la osteocalcina humana intacta (OC) y el pro-

péptido carboxi-terminal del colágeno tipo I (PICP); reabsorción ósea, el telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I (ICTP); la hormona paratiroidea (PTH); hormona de crecimiento, IGF-I (*Insulin-Like Growth Factor-1*) e IGFBP-3 (*Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3*); y vitamina D, sus metabolitos 25-hidroxi y 1,25-dihidroxi-vitamina D₃. Para descartar otras enfermedades que pueden afectar al metabolismo óseo, se analizaron la hormona tiroestimulante y las hormonas sexuales.

Se caracterizaron los polimorfismos para las enzimas *Fok I*, *Apa I* y *Taq I* del gen VDR (*Vitamin D Receptor*), *Xba I* y *Pvu II* del gen ER (*Estradiol Receptor*), y *Msc I* del gen COL 1a1 (Colágeno tipo I) mediante amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y digestión con endonucleasas de restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphisms*), en ambos grupos de pacientes y en un grupo control formado por 143 niños sanos. Por convenio, los alelos que no poseían la diana de restricción (ausencia de corte) se han designado con letra mayúscula, y los que sí la poseían (presencia de corte), con letra minúscula.

Los resultados se expresaron como media y desviación típica o mediana y rango intercuartílico (RIQ) según la distribución normal de los datos. La comparación de los valores expresados como SDS se realizaron mediante t de Student para muestras independientes o sus equivalentes U-Mann-Whitney/Prueba de los signos; y su análisis en función de los distintos genotipos, se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) y t de Student. La comparación de las frecuencias de los genotipos para los polimorfismos estudiados se realizó mediante chi-cuadrado de Pearson. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando su probabilidad asociada era $p \leq 0,05$. El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, versión 10.0, Chicago, Illinois).

RESULTADOS

Los pacientes afectados de OS y SE presentan, en el momento del diagnóstico, una talla significativamente

mayor que la población de referencia ($p < 0,001$ y $p = 0,013$, respectivamente), pero sólo los OS presentan un peso significativamente mayor ($p = 0,004$).

Entre los afectados de OS, el genotipo heterocigoto *Ff* para el polimorfismo *Fok I* del gen VDR es significativamente más frecuente que los genotipos *FF* y *ff* ($p = 0,048$) respecto al grupo control. En los afectados de SE, aunque no se observan diferencias en la distribución de frecuencia de genotipos, sí existen en la talla en relación con los genotipos. Así, los heterocigotos *Ff* poseen una talla menor que los homocigotos (*FF* y *ff*) ($p = 0,004$), y los *ff* tienden a presentar una talla mayor que los *FF* y *Ff* ($p = 0,069$) (Fig. 1).

No existen diferencias en la distribución de frecuencias para los demás polimorfismos estudiados de los genes VDR, ER y COL 1a1. Por otra parte, se ha observado una asociación estadísticamente significativa entre el alelo *A* para el polimorfismo *Apa I* y el alelo *t* para el polimorfismo *Taq I* del gen VDR; y entre los alelos *P* y *X* (p y x , respectivamente) para los polimorfismos *Pvu II* y *Xba I* del gen ER ($p < 0,001$).

La DMO lumbar de los pacientes con OS y SE es significativamente menor que la de la población de referencia ($p \leq 0,001$) (Fig. 2), y parece estar influenciada por la edad que presentan los niños al diagnóstico. Así, los pacientes en edad puberal presentan una DMO lumbar significativamente menor ($p < 0,001$ para los OS y $p = 0,007$ para los SE) que la población de referencia, pero no aquellos que ya habían finalizado su desarrollo puberal. No se observan diferencias significativas en la DMO de los pacientes entre los genotipos para los polimorfismos analizados.

En los pacientes afectados de OS, el ICTP está significativamente alterado (elevado o disminuido) en el grupo con enfermedad respecto al de remisión ($p = 0,001$ y $p = 0,005$, respectivamente). El PICP de los enfermos de SE está disminuido de forma significativa respecto a los que se hallan en remisión ($p = 0,018$), con funciones hepática y renal normales. No se observan diferencias en los demás marcadores bioquímicos y hormonales analizados. Respecto a la determinación de hor-

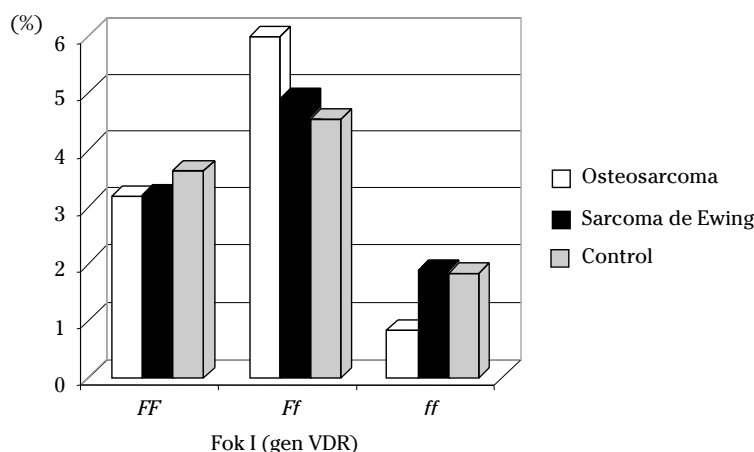


Figura 1. Relación entre la talla y los genotipos para el polimorfismo *Fok I* del gen VDR en pacientes afectados de osteosarcoma y sarcoma de Ewing.

monas sexuales: el 83,9% y 73,7% de los varones enfermos y en remisión con OS y SE, respectivamente, presentan valores disminuidos de testosterona; el estradiol está significativamente disminuido en todas las mujeres con enfermedad respecto a las que se hallan en remisión ($p = 0,013$); y no existen alteraciones significativas en los valores de gonadotrofinas (Tabla 1).

No se observan diferencias significativas en la DMO lumbar de los pacientes en remisión con ambos tipos de tumores óseos en función de los marcadores séricos bioquímicos y hormonales estudiados.

CONCLUSIONES

Los pacientes afectados de OS y SE presentan, al

diagnóstico, una talla significativamente mayor que la población de referencia. El polimorfismo *Fok I* del gen VDR parece influenciar la talla de estos pacientes.

La DMO lumbar está disminuida de forma significativa en los niños con tumores óseos en remisión, y el grado de afectación parece estar relacionado con la edad de los pacientes al diagnóstico e inicio de los tratamientos antitumorales.

Los marcadores séricos de formación (PICP) y reabsorción ósea (ICTP), así como las hormonas sexuales, están alterados en los niños con enfermedad tumoral ósea y tienden a normalizarse una vez alcanzada la remisión clínica.

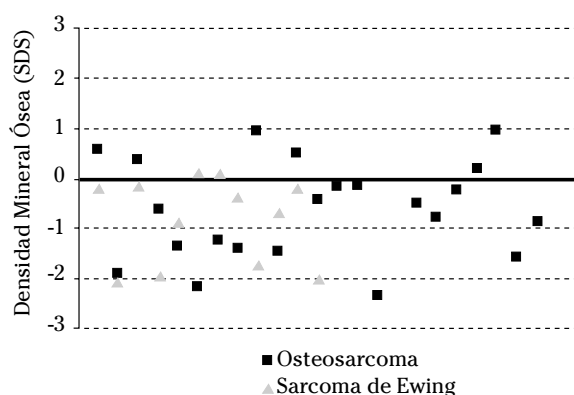


Figura 2. Densidad mineral ósea en los pacientes afectados de osteosarcoma y sarcoma de Ewing en comparación con la de la población de referencia.

Tabla 1. Marcadores séricos bioquímicos y hormonales de metabolismo óseo en pacientes afectados de osteosarcoma y sarcoma de Ewing.

| | OSTEOSARCOMA | | SARCOMA de EWING | |
|--|------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| | ENFERMEDAD (n = 21) | REMISIÓN (n = 54) | ENFERMEDAD (n = 16) | REMISIÓN (n = 32) |
| PICP (mg/L) | 63,73 (28,04) | 44,34 (34,13; 62,35) | 46,29* (34,48;88,58) | 53,21 (47,44;74,70) |
| ICTP (mg/L) | 6,65 (3,27) | 2,70** (1,83; 4,80) | 5,35 (4,12;10,04) | 3,17 (2,46;4,33) |
| OC (ng/mL) | 4,36 (2,83; 7,75) | 3,96 (1,92; 8,30) | 3,73 (2,38) | 4,94 (3,44;7,41) |
| IGF 1 (ng/mL) | 111,36 (71,22) | 80,25 (61,30; 108,75) | 98,49 (45,76) | 131,76 (50,73) |
| IGFBP3 (ng/mL) | 1310 (1087; 1726) | 1285 (1020; 1584) | 1289,93 (455,33) | 1445,66 (321,65) |
| PTHi (pg/mL)² | 19,05 (11,77;21,85) | 11,90 (8,90;17,65) | 12,18 (4,85) | 12,66 (3,98) |
| 1,25-VITD₃ (pg/mL)³ | 29,71 (13,97) | 27,66 (8,26) | 32,14 (24,63;49,91) | 24,50 (7,67) |
| 25-VITD₃ (ng/mL)³ | 13,23 (3,77) | 19,33 (6,39) | 13,64 (8,48;20,80) | 20,78 (6,95) |

PICP: Propéptido carboxiterminal del colágeno tipo I; ICTP: Telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I; OC: osteocalcina; IGF 1: *insulin-like growth factor I*; IGFBP3: *binding protein 3*; PTHi: parathormona intacta; 1,25-Vit D₃: 1,25-dihidroxitamina D₃; 25-Vit D₃: 25-hidroxitamina D₃. Valores expresados como media (S) o mediana (RIQ). *Prueba exacta de Fisher (disminuido, $p = 0,018$ en el grupo con enfermedad respecto al de remisión). **Prueba exacta de Fisher (elevado, $p = 0,005$; disminuido, $p = 0,001$ en el grupo con enfermedad respecto al de remisión).

Mutaciones en el gen de la metionina adenosiltransferasa 1A e importancia de la AdoMet en la fisiopatología del hígado

E. Santamaría, C. Miqueo, S. Harvey*, J.M. Mato, F.J. Corrales

División de Hepatología y Terapia Génica. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.

*Laboratory of Molecular Biology. National Institute of Mental Health. Bethesda, Maryland. USA.

Fundamento. Las lesiones hepáticas representan un importante problema de salud en el mundo. Solamente el virus de la hepatitis C afecta a 3 millones de personas en Europa, de los cuales aproximadamente el 65% desarrollan hepatopatías crónicas, cirrosis o hepatocarcinoma. La evolución de estas patologías es lenta y de difícil predicción con los medios disponibles. Uno de los factores que juega un papel clave en la patogénesis de enfermedades hepáticas es la deficiencia de S-adenosilmetionina (AdoMet). Por ello, mutaciones en el gen *MAT1A* que dan lugar a formas de metionina adenosiltransferasa hepática (MATI/III) inactiva o parcialmente activa y, por lo tanto, a una deficiente síntesis de (AdoMet), cisteína y glutatión, podrían ser consideradas como un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades hepáticas. En este trabajo se describe como una disminución de los niveles hepáticos de AdoMet induce la aparición de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y hepatocarcinoma (HCC) en un ratón knockout para el gen *MAT1A*. Así mismo, hemos diagnosticado 2 mutaciones, una de ellas no había sido descrita previamente, en el gen *MAT1A* en 4 pacientes y hemos establecido las bases moleculares de la herencia dominante asociada a la mutación R265H en la MATI/III.

Material y métodos. *Análisis de las muestras.* Se han utilizado en el estudio muestras de sangre o tejido de pacientes facilitadas por la Clínica Universitaria de Navarra y por el Hospital Clínico de Barcelona. La obtención del DNA de las muestras se realizó por técnicas convencionales, utilizando el kit Purigene de Gentra. El gen *MAT1A* se caracterizó mediante la amplificación (PCR) de la zona codificante constituida por los exones I a IX, utilizando las parejas de oligonucleótidos ya descritas. Los fragmentos amplificados por PCR se secuenciaron para detectar las posibles mutaciones. Las mutaciones así como su presencia en uno o los dos alelos se confirmaron mediante la utilización de enzimas de restricción adecuadas que permitan establecer un mapa de restricción diferencial en función de la presencia o no de la mutación.

Técnicas analíticas. Las formas mutantes de la MATI/III se sobreexpresaron en *E. coli* y se purificaron mediante cromatografía líquida según los métodos desarrollados en nuestro laboratorio. Los estudios de actividad biológica y caracterización enzimática de las diferentes proteínas purificadas se realizó mediante técnicas bioquímicas convencionales. El estado oligomérico, así como la capacidad de formar heterodímeros se analizó por técnicas cromatográficas (exclusión molecular).

Resultados y Discusión. La S-adenosilmetionina es un metabolito clave en el metabolismo celular. Recientes investigaciones demuestran que la AdoMet además de ser el primer producto del catabolismo de la metionina, juega un papel esencial en el control de procesos tan fundamentales como proliferación y diferenciación celular. Se ha demostrado que es esencial mantener unos niveles altos de AdoMet en el hígado para mantener su función metabólica normal y que la disminución de los niveles de AdoMet en hígado favorece la proliferación y dediferenciación de los hepatocitos. La metionina adenosiltransferasa es la enzima responsable de la síntesis de AdoMet utilizando como sustratos metionina y ATP. En mamíferos se han descrito tres formas de MAT, MATI, MATII y MAT III. MATII es producto del gen *MAT2A* que se expresa fundamentalmente en tejidos extrahepáticos, hígado fetal y hepatocarcinoma. MATI y MATIII son un tetrámero y un dímero de la misma cadena polipeptídica, codificada por el gen *MAT1A*, que se expresa mayoritariamente en hígado adulto. Alteraciones en el gen *MAT1A* o en MATI/III condicionaría la producción de AdoMet en hígado adulto. Diversos estudios sugieren que una deficiencia en la producción de AdoMet en hígado puede ser clave en la patogénesis de enfermedades hepáticas como la cirrosis. Recientemente hemos desarrollado un modelo de ratón knockout de *MAT1A* (MAT-0) para determinar la influencia de la MAT I/III y la AdoMet sobre la proliferación del hígado, daño hepático y hepatocarcinogénesis. A los 3 meses, los ratones MAT-0 presentaban una marcada hipermetioninemia, una reducción del 74% de los niveles hepáticos de AdoMet y un aumento del 40% del peso del hígado. Utilizando técnicas de microarray encontramos que la expresión de aproximadamente el 2% de los genes está alterada en el ratón MAT-0. Entre ellos, cabe destacar la inducción de genes relacionados con proliferación, como *early growth response 1*, PCNA, PPAR γ , marcadores de respuesta aguda, como orosomucoide, amiloide o antígeno FAS, y diversos genes implicados en metabolismo hepático. A los 3 meses los ratones MAT-0 son mucho más susceptibles a desarrollar esteatosis macrovesicular severa como consecuencia de una dieta deficiente en colina, a los 8 meses desarrollan espontáneamente esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y a los 18 meses presentan hepatocarcinoma. Estos resultados sugieren que una deficiencia en la producción de AdoMet en hígado es un factor crucial en el inicio y progresión de patologías como la NASH y el hepatocarcinoma.

Se han descrito 17 mutaciones del gen *MAT1A* que se presentan de manera natural en humanos. Estas mutaciones comprometen, en mayor o menor medida,

la actividad de la enzima MAT1/III. La disminución de la actividad de la MAT1/III es la responsable de la hipermetioninemia persistente que se ha descrito en estos pacientes. Hasta el momento no se han descrito alteraciones hepáticas en los individuos con mutaciones en el gen *MAT1A*. Sin embargo, una deficiencia en la síntesis de AdoMet puede aumentar la sensibilidad del hígado a desarrollar lesiones hepáticas, como lo demuestran los estudios referidos anteriormente. Nuestro interés se ha centrado en el estudio de una de las mutaciones, la responsable de la sustitución de un residuo de arginina en posición 265 por histidina (R265H) en la MAT1/III. A diferencia del resto de las mutaciones en el gen *MAT1A*, el fenotipo asociado al mutante R265H se hereda de forma dominante y se propuso que podía tener una mayor incidencia en la población. Esta mutación produce una forma monomérica de la MAT1/III, que es inactiva en cuanto a síntesis de AdoMet, pero mantiene la actividad tripolifosfatasa característica de esta enzima. La arginina 265 forma un puente salino con el glutámico 58 de la subunidad complementaria que es esencial para mantener la estructura dimérica de la MAT1/III. El cambio de esta arginina por histidina en el mutante R265H impide la formación de este puente salino y, por tanto, bloquea la capacidad de formar homodímeros. Sin embargo, el mutante R265H forma un puente salino mediante su glutámico 58 y la arginina 265 de subunidades salvajes dando lugar a formas híbridas, heterodiméricas de MAT I/III. Los heterodímeros resultantes mantienen su actividad tripolifosfatasa, pero no recuperan la capacidad de sintetizar AdoMet. La falta de actividad sintética del heterodímero es, probablemente, consecuencia de una asociación no nativa entre las subunidades que lo constituyen. La formación de heterodímeros inactivos explica, a escala

molecular, la herencia dominante del fenotipo asociado a la mutación R265H en MAT1/III.

Dada la importancia de la AdoMet en la fisiopatología hepática, la detección de mutaciones en el gen *MAT1A* es esencial para tomar medidas preventivas que permitan evitar o paliar las consecuencias de la disminución del AdoMet hepático en los pacientes portadores de las mutaciones. Una vez realizado el diagnóstico de hipermetioninemia persistente (existe un centro de referencia en los NIH, USA, dirigido por el Dr. Harvey Mudd, que coordina el seguimiento de estos pacientes a escala mundial), el diagnóstico genético se realiza en nuestro laboratorio. Recientemente han sido detectadas dos personas en Corea que presentan hipermetioninemia persistente. Hemos encontrado dos mutaciones: una transición G-A en posición 1159 que supone la introducción de un codón de parada en la secuencia en posición 387 (W387X) y, por tanto genera una MAT truncada con 11 aminoácidos menos en el extremo C terminal (esta mutación no había sido descrita previamente); y una transición G-A en posición 1130 que supone el cambio de una glicina por una serina en posición 378 (G378S) que resulta en una forma de MAT1/III inactiva. Tanto los resultados de la secuenciación como los análisis de los mapas de restricción nos permiten concluir que de los cuatro pacientes estudiados, uno es homocigoto para la mutación W387X, el otro es heterocigoto para la mutación G378S y otros dos son heterocigotos para las dos mutaciones mencionadas. Estos resultados nos permiten concluir que la causa de la hipermetioninemia persistente en estos pacientes se debe a mutaciones en el gen *MAT1A*, como consecuencia de las cuales se produce una severa deficiencia en la actividad de la MAT1/III.

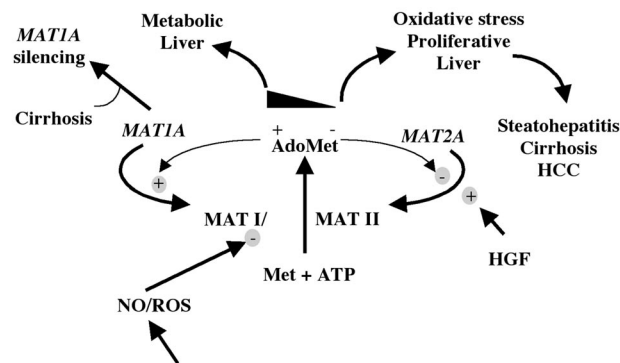


Figura 1. Representación esquemática de la regulación del metabolismo de AdoMet en hígado y sus implicaciones fisiopatológicas.

Prevalencia de la enfermedad celíaca en la población escolar navarra

M. Palacios, F. Sánchez-Valverde, P. Zugarramurdi, A. Rivero, M.D. García San Martín, M.A. Ramos, S. Orradre

Centro de realización: Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital de Navarra.

FUNDAMENTO

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía motivada por una especial sensibilidad al gluten, de carácter permanente, que cursa con una lesión importante de la mucosa del intestino delgado, no patognomónica, habitualmente asociada a signos clínicos y/o funcionales de malabsorción, pero que sólo representa el 30-40% del espectro total de individuos sensibles al gluten, ya que la gran mayoría de pacientes cursa sin síntomas aparentes o al menos sin los clásicos conocidos.

En el momento actual la teoría más aceptada respecto a la enfermedad celíaca es la "teoría del iceberg", que a modo de resumen consiste en que las formas de presentación clínica son varias: la forma clásica o forma digestiva, que tiene una incidencia aproximada de 1/1.000-2.000 RN vivos, según las zonas geográficas, y que sería sólo la punta del iceberg. Si a esta forma añadimos la búsqueda de las formas "atípicas" esta incidencia sube hasta 1/600-700. Y si se estudia la EC en grupos de riesgo como son: familiares, síndrome de Down, esterilidad etc., esta incidencia va aumentando progresivamente, y constituiría de forma gráfica la parte oculta del iceberg. Por último, diversos autores han realizado estudios poblacionales para saber cual es la incidencia en la población general previamente sana de la EC, tratando de encontrar la llamada "EC silente", y las cifras encontradas están entre 1/125 y 1/200 casos de EC. Los estudios se han realizado en muestras representativas de poblaciones, donantes de sangre y en el contexto de exámenes periódicos de salud.

El objetivo de este trabajo ha sido:

- 1) Conocer la prevalencia de serología positiva a EC en una población infantil de Navarra.
- 2) Calcular, basándose en esa serología, la prevalencia total de la EC en nuestra población, añadiendo a dicha prevalencia las cifras de que disponemos de nuestros estudios recientes.
- 3) Según las cifras encontradas, plantear la posibilidad de la detección de EC silente dentro de los programas de salud de controles periódicos del niño.

MATERIAL Y MÉTODOS

El número total de sueros analizado ha sido de 1.932, estudiados de forma anónima, pertenecientes a una población escolar navarra, recogida en las aulas escolares, por conglomerados y seleccionados entre 6 y 14 años.

Se estudiaron 3 clases de autoanticuerpos: a) los anticuerpos anti-endomisio (IgA-AEM) cuantificados por fluorescencia indirecta, utilizando como sustrato antigénico la porción distal de esófago de mono. Los

sueros se diluyeron al 1:5 en tampón fosfato 50 mM pH 7,8 considerándose un valor positivo por encima de esta dilución (U/ml); b) los anticuerpos anti-gliadina (IgA-AGA) se cuantificaron por un método inmunoenzimático utilizando un equipo comercial con gliadina procedente de trigo como sustrato, estableciéndose los valores positivos por encima de 12 unidades arbitrarias (UA); c) los anticuerpos anti-transglutaminasa (IgA-tTG), evaluados también con un método inmunoenzimático que utiliza un sustrato de transglutaminasa de origen humano. Se consideró un valor positivo por encima de 10 U/ml.

Previamente se había evaluado la imprecisión intra e interensayo, siempre menor de 12%. Además en estudios previos habíamos hecho un estudio de sensibilidad y especificidad para los 3 métodos.

RESULTADOS

De las 1.932 muestras estudiadas, 14 casos (0,72%) presentaron anticuerpos anti-transglutaminasa positivos y 22 casos (1,13%) anti-gliadina positivos. Los anticuerpos anti-endomisio se cuantificaron en 450 sueros, concretamente en una muestra de 428 sueros analizados al azar y en todos aquellos casos que presentaban un anticuerpo positivo, fuera éste anti-transglutaminasa o anti-gliadina, lo que dio como resultado 10 casos positivos de los estudiados. Estos 10 casos, que presentaron el Ac anti-endomisio positivo, presentaban también positivos los Acs anti-transglutaminasa.

En 7 casos se presentaron conjuntamente positivos los 3 anticuerpos estudiados.

CONCLUSIONES

1.- De una muestra representativa de 1.932 sueros de la población pediátrica de Navarra, 22 casos (1,13%) tenían al menos un marcador serológico de EC positivo. En 7 casos (0,36%) eran positivos los 3 autoanticuerpos investigados, IgA tTG, AGA, y AEM. En 10 casos (0,51%) eran positivos los IgA tTG y AEM.

2.- La prevalencia "deducida" de EC en nuestra población se puede extrapolar, a la vista de la especificidad de nuestros métodos serológicos, entre 1/276 (3 autoanticuerpos positivos) y 1/193 (2 autoanticuerpos positivos), y en Navarra sobre una población 135.947 niños de 4 a 17 años habría 493-704 celíacos silentes, o lo que es lo mismo la prevalencia sería de un 0,3 y un 0,5%, respectivamente.

Estos resultados demuestran que la condición celíaca puede estar presente en población aparentemente sana. La EC silente puede asociarse con otras entidades como tumores malignos del tubo digestivo, anemia ferropénica, enfermedades autoinmunes, osteoporosis, infertilidad, etc. La aplicabilidad de estos resultados

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CONCEDIDOS DPTO. DE SALUD

sería realizar estudios de *screening* generalizado en toda la población infantil, por ejemplo a los 2-3 años, como ya ha sido realizado en otros países.

Nosotros desde aquí plantearíamos la posibilidad de que dentro de los exámenes periódicos de salud se realice una determinación sistemática de autoanticuerpos de EC, con un sistema rápido tipo ELISA que a la vista de la concordancia de nuestros resultados pudiera

ser la determinación de Ig A anti-transglutaminasa humana, haciendo un estudio serológico, digestivo y genético completo de aquellos casos que se detecten con este anticuerpo positivo. La detección precoz de casos de EC mediante estudios de *screening* poblacional, evitaría la aparición de las complicaciones antes descritas y mejoraría la salud general de la población, con un ahorro previsible del gasto sanitario a largo plazo.