

Actualidades 2002

EN EL LABORATORIO CLÍNICO

Contenidos

1. PCR cuantitativa a tiempo real
2. Hemocromatosis hereditaria
3. Osteoporosis y genética
4. Osteoprotegerina y sistema Rankl/Rank
5. Legionella pneumophila
6. Bases moleculares del linfoma
7. Pepsinógeno
8. Micofenolato

1. PCR cuantitativa a tiempo real

Dra. Teresa Agulló Ortuño, Dra. Lucía García Mancebo y Dr. Francisco Cañizares Hernández
Laboratorio de hormonas. Servicio de Análisis Clínicos. H.U. «Virgen de la Arrixaca»

1.1. Introducción

Desde su introducción en la primera mitad del año 1980, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido modificada y optimizada para un mayor número de aplicaciones. Es un proceso repetitivo en el cual ocurren tres reacciones (desnaturalización de la doble hebra de ADN, alineamiento de los cebadores y elongación de la cadena), a tres temperaturas diferentes (generalmente 94 °C, 55 °C y 72 °C, respectivamente) y durante tres tiempos en cada ciclo, en función de las condiciones que el investigador desee aplicar. La desnaturalización, alineamiento y elongación ocurre a diferentes ritmos dependiendo de la temperatura, y las reacciones múltiples pueden ocurrir simultáneamente. La temperatura de las muestras no cambia instantáneamente, pero ocurre como transiciones suaves.

1.2. PCR cuantitativa

La propiedad extremadamente sensitiva, debido a la multiplicación repetitiva de moléculas usadas como molde de la PCR, es en cierta forma un retroceso para la cuantificación, ya que pequeñas diferencias del factor de multiplicación resultan grandes en la cantidad de producto.

Para resolver este problema, se pueden utilizar dos métodos:

1. **Cinético**, basado en la determinación o comparación del factor de amplificación.
2. **Coamplificación**, el cual compara la cantidad de producto amplificado con una simultánea amplificación estándar.

Para la selección del método adecuado, son necesarias consideraciones teóricas y prácticas. El método cinético es el más conveniente si la PCR puede ser realizada sin apertura de tubos, como en la metodología de detección por fluorescencia, con muy baja imprecisión (menor del 5%), mientras que el método de coamplificación puede ser usado sin equipos caros adicionales, pero requiere el trabajo en paralelo de varios tubos de PCR, con una gran variabilidad del proceso.

El perfil de la reacción PCR puede describirse a través de tres segmentos: una temprana fase de desnaturalización, una fase de crecimiento exponencial o fase logarítmica y un plateau. La fase de desnaturalización dura hasta que la señal de los productos PCR es mayor que la señal del sistema. La fase de crecimiento exponencial comienza cuando el suficiente producto se acumula para ser detectado y termina cuando la eficiencia de la reacción desciende hasta que la reacción entra en plateau.

La PCR cuantitativa permite medir la acumulación de productos PCR durante el curso de la reacción. Bajo las condiciones apropiadas, el número de ciclos de PCR requeridos para

la acumulación de una cantidad específica de producto (durante la fase exponencial de la reacción) es un reflejo de la cantidad relativa de la secuencia de ácido nucleico presente en la muestra que se está analizando. Esta metodología permite el análisis de un número de muestras relativamente grande en un período corto de tiempo, potencialmente permitiendo usar múltiples marcadores sobre una misma muestra, dentro de un período de tiempo compatible con los requerimientos clínicos asistenciales.

El análisis de los productos de la PCR durante la amplificación se conoce como «**PCR a tiempo real**». La manera más fácil de monitorizar la PCR durante la amplificación es con la fluorescencia emitida por un fluoróforo que hibride con doble hebra de ADN, pero no con hebra sencilla; conforme progresa la síntesis de doble hebra de ADN, la fluorescencia se incrementará. Si en un gráfico enfrentamos la fluorescencia frente al número de ciclos, la acumulación de productos de PCR se puede visualizar como una curva de crecimiento similar a las curvas de crecimiento bacteriano, con una fase logarítmica inicial, una fase logarítmica de crecimiento exponencial y una fase plateau final. La monitorización de la fluorescencia de cada ciclo es un poderoso modo de cuantificar el número inicial de copias de la secuencia. Concentraciones muy altas de la secuencia cambian la curva de crecimiento en los ciclos iniciales. Este cambio puede ser cuantificado como un número fraccionario del ciclo y es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración de la secuencia inicial.

Hay varios momentos durante la temperatura de los ciclos donde la adquisición de fluorescencia es informativa. De los productos PCR podemos medir T_m (temperatura del punto medio de la curva de fusión de un fragmento de ADN) que aumenta de modo lineal con el contenido en pares de bases guanina-citosina para la identificación de alteraciones de secuencia.

Durante la fase logarítmica, el curso de la amplificación se describe por la ecuación:

$$T_n = T_o (E)^n$$

Siendo T_n la cantidad de secuencia diana en un determinado ciclo, n el número de ciclos, T_o la cantidad inicial de secuencia diana y E la eficiencia de la amplificación.

La máxima eficiencia posible en PCR es 2 (cuando cada producto PCR es replicado en cada ciclo). El valor mínimo es 1, correspondiendo a no-amplificación.

El ciclo en donde la reacción comienza a elevarse de forma exponencial constante, cumpliéndose sólo en un número indeterminado de ciclos, es dependiente de la cantidad de secuencia diana presente al comienzo de la reacción. Esta es la base de la PCR cuantitativa a tiempo real.

En la PCR a tiempo real, el momento de inicio de la fase exponencial es fácilmente identificado. Si tuviéramos datos sobre la concentración de productos de PCR para cada ciclo, el investigador puede fácilmente identificar los ciclos exponenciales después de que la reacción haya comenzado. Para salvar este problema, se construye la curva estándar externa, se trata de una curva en la que cada punto representa una cantidad conocida de productos PCR en cada curva de amplificación. Podemos llamar a estos puntos "puntos de cruce". Si el número de copias de productos PCR presentes en el punto de cruce es K , y el número de ciclo es C_p , entonces la ecuación anterior se convierte en:

$$K = T_o (E)^{C_p}$$

En forma lineal:

$$C_p = - (1/\log E) \log T_o + (\log K/\log E)$$

Por tanto, C_p es función de la concentración inicial T_o .

El número de puntos en la curva estándar afecta a la reproducibilidad. Las variaciones en la curva estándar están relacionadas con la raíz cuadrada del número de puntos de la curva, pero si incrementamos demasiado el número de puntos, disminuimos la ganancia de esta estrategia.

El número absoluto de copias de una muestra también afecta a la reproducibilidad. Como se debe esperar, un alto número de copias es más reproducible que un número bajo.

1.3. Problemática

Un problema adicional en la cuantificación por PCR es que los resultados finales son siempre relativos a algo (por copias de otro gen de referencia, copias por célula, copias por unidades de absorbancia, por gramos de tejido, por ml de sangre, etc.). Es muy importante la elección del denominador a la hora de expresar nuestros resultados cuantitativos, sobre todo cuando se trata de aquellos resultados en que cambios relativos en el número de copias pueden implicar repercusiones clínicas y terapéuticas importantes.

La PCR cuantitativa es una técnica con la cual obtener resultados fidedignos de expresión génica, que difícilmente se podrían obtener por otros medios más convencionales. No obstante, el diseño experimental debe ser muy elaborado y cuidadoso, así como su ejecución y análisis posterior.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferre F, Marchese A, Pezzoli P, Griffith S, Buxton E, Boyer V. Quantative PCR: an overview. In: Mullis KB, Ferre F, Gibbs RA (eds). The polymerase chain reaction. Birkhauser, Boston 1994; 67-88.
2. Wang Z, Spandoro J. Determination of target copy number of quantitative standards used in PCR-based diagnostic assays. In: Ferre F (eds). Gene quantification. Birkhauser, Boston 1998; 31-43.
3. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. Biotechniques 1998; 24: 954-8.
4. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques 1997; 22: 130-8.
5. Schutz E, von Ahsen N. Spreadsheet for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. Biotechniques 1999; 27: 1218-22.
6. Pals G, Pindolia K, Worsham MJ. A rapid and sensitive approach to mutation detection using real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis, using BRCA1 as an example. Mol Diag 1999; 4: 241-6.

2. Hemocromatosis hereditaria

Dra. Margarita Garcés Santos y Dr. Francisco Cañizares Hernández

Laboratorio de hormonas. Servicio de Análisis Clínicos. H.U. «Virgen de la Arrixaca»

2.1. Introducción

La hemocromatosis hereditaria es la enfermedad congénita de mayor frecuencia en la raza blanca. Estudios de población, basados en ensayos fenotípicos utilizando la sobrecarga férrica como marcador, muestran cómo en la población caucásica parece afectar a 1 de cada 200 a 400 individuos.

Su herencia es autosómica recesiva y está caracterizada por el incremento de los depósitos de hierro en hígado, páncreas, corazón, articulaciones y otros órganos, como consecuencia de la pérdida de la regulación de la absorción de este metal.

La evolución de la enfermedad puede ser frenada mediante sangrías periódicas, lo que justifica que se intente realizar un diagnóstico precoz, antes de que se produzca el daño irreversible (cirrosis, hepatocarcinoma, miocardiopatía, diabetes mellitus, impotencia, artritis), consiguiéndose que la esperanza de vida de estos pacientes sea equiparable a la de la población normal.

2.2. Datos de laboratorio

El índice de saturación de transferrina (IST), está considerado como la prueba de cribado más efectiva y de mayor rentabilidad para discriminar posibles afectados por la enfermedad. El punto de corte del IST para considerar que existe sobrecarga férrica varía desde el 45-60%, dependiendo de los autores. En todo caso, es más alto en hombres que en mujeres debido posiblemente a las pérdidas sanguíneas de la menstruación y/o embarazo, así el Colegio Americano de Patólogos (CAP), lo establece en 60% en hombres y 50% en mujeres.

En 1996, fue clonado el gen de la hemocromatosis (HFE), que está en el brazo corto del cromosoma 6, y posteriormente se han descrito dos mutaciones principales; la mutación en el aminoácido 282, en la que la cisteína es sustituida por tirosina (C282Y), y la mutación en el aminoácido 63, en el que la histidina es sustituida por aspártico (H63D).

Los homocigotos para la mutación C282Y expresan fenotipo de hemocromatosis en un porcentaje muy alto, pero que varía según la población considerada. La mayoría de homocigotos C282Y asintomáticos son mujeres premenopáusicas, mientras que para los hombres mayores de 40 años la penetrancia de la homocigosidad C282Y es del 95% para la sobrecarga de hierro. Los heterocigotos dobles, C282Y/H63D, pueden presentar algunos rasgos bioquímicos, pero muy pocas veces tienen expresión clínica, a menos que se den otros factores coadyuvantes como alcoholismo, anemia hemolítica o porfiria cutánea tarda. Los homocigotos H63D pueden presentar el fenotipo de hemocromatosis, pero no está claro que esta mutación sea capaz por sí sola de dar lugar a la sobrecarga de hierro.

Hay un 20% de hemocromatosis no asociadas a los fenotipos C282Y y H63D que escaparían del diagnóstico genético, esto ayuda a comprender que la biopsia hepática sea aún hoy día el patrón de oro para el diagnóstico de la hemocromatosis, ya que posibilita la cuantificación química del hierro expresado por el índice hepático de hierro (IHH): ($\mu\text{moles de Fe/g de hígado seco}$)/edad del paciente. Un índice superior a 1,9 indica hemocromatosis.

Una tercera alteración de bases que reemplaza serina por cisteína (S65C) se presenta en el 1,5% de la población europea. Aunque S65C se considera un polimorfismo benigno, un genotipo C282Y/S65C puede conferir un ligero incremento en el riesgo de enfermedad, contribuyendo a un fenotipo de enfermedad leve.

Se han detectado otras mutaciones HFE en familias individuales cuya frecuencia y efectos en la población general quedan todavía por estudiarse.

2.3. Mecanismo de acción de las mutaciones

El producto proteico del gen HFE es una glicoproteína transmembrana de tipo I, con 343 residuos aminoácidos, que contiene una cadena pesada unida a la membrana con 3 dominios extracelulares. Se piensa que la HFE regula la toma de hierro por un mecanismo que implica el enlace dependiente del pH con la proteína receptora de la transferrina. De acuerdo con este mecanismo, las células adquieren hierro gracias a la transferrina que transporta dos iones hierro; ésta se une a pH 7,4 a un dímero formado por dos moléculas del receptor de transferrina que está en la membrana celular. Todo este complejo entra a la célula por endocitosis, luego se libera el hierro dentro de la célula y es transportado al citoplasma, volviendo la transferrina y su receptor a la superficie celular.

Aunque el mecanismo molecular exacto con que actúa la HFE se discute, se piensa que la proteína HFE se une al receptor de transferrina e influencia el reparto intracelular de hierro mediado por el complejo hierro-transferrina. Hay varios modelos propuestos, pero el que parece más probable se basa en que la HFE bloquea el enlace de transferrina al receptor de transferrina y es responsable de la regulación negativa de la toma de hierro. La HFE se asocia con el receptor de transferrina en o en la proximidad del sitio de enlace, e inhibe competitivamente la unión con hierro-transferrina.

Se han estudiado, los efectos de las mutaciones C282Y y H63D en la función y estructura de la proteína HFE. La C282Y, convierte un residuo Cys en uno de Tyr, y esto evita la formación de un puente disulfuro, alterando el plegamiento de la proteína HFE. La proteína mutante no se une a la beta-2-microglobulina, lo que impide el transporte de la proteína y la expresión en la superficie de la célula; la proteína es retenida en el retículo endoplasmático y es degradada aceleradamente, produciendo como resultado final la pérdida de la función de la proteína.

La mutación H63D da lugar a una proteína que se expresa en la superficie de la célula, pero con una interacción con el receptor de la transferrina distinta a la del alelo salvaje. Como resultado se deposita más hierro en las células.

2.4. Criterios diagnósticos de la hemocromatosis hereditaria

En cuanto a los criterios diagnósticos, se consideran sugestivos de hemocromatosis hereditaria, en ausencia de otras causas potenciales de sobrecarga férrica, IST persistentemente incrementada (50% para mujeres premenopáusicas y 60% para hombres

y mujeres posmenopáusicas) y ferritina elevada (>200µg/l para mujeres premenopáusicas o >300µg/l para hombres y mujeres posmenopáusicas).

Ante un aumento de IST, la detección de las mutaciones de la hemocromatosis confirma el diagnóstico en pacientes sintomáticos y resulta básico para detectar los casos subclínicos, como cribaje, habiendo demostrado ser coste-efectivo.

Para detectar las mutaciones del HFE existen varios métodos, basados en la amplificación de la región específica del gen por PCR y posterior detección de la mutación. Los métodos más comunes usan una enzima de restricción para diferenciar los alelos (enzima que corta el alelo que contiene la mutación, pero no el de tipo salvaje), seguidos de electroforesis para diferenciar el alelo mutante del alelo salvaje, por diferencia del tamaño de los fragmentos de ácidos nucleicos.

La ampliación de alelos específicos es otro método usado comúnmente. En este, cebadores específicos del alelo salvaje o del mutante están diseñados para que la posición de la mutación se encuentre cercana al extremo 3' del cebador. Cada uno de estos, amplificará solamente su alelo específico. La presencia o ausencia de amplificación con los cebadores específicos identifica el genotipo.

Un tercer método utiliza para este mismo modelo de hibridación cebadores comunes para alelos mutados y salvajes, pero los que son específicos son las sondas de hibridación marcadas radiactivamente o fluorescentemente, identificando así los diferentes alelos por las distintas temperaturas de fusión en PCR a tiempo real.

BIBLIOGRAFÍA

1. Witte DL, Crosby WH, Edwards CQ, Fairbanks VF, Mitros AA. Practice guideline development task force of College of American Pathologists. Hereditary Hemochromatosis. Clin Chem Acta 1996; 245: 139-200.
2. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, *et al.* A novel MHC class-I like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. Nat Genet 1996; 13: 399-408.
3. Espinós Pérez D. Algunos comentarios sobre la hemocromatosis. Anales Medicina Interna 2000; 17: 625-7.
4. Lyon E, Frank EL. Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene. Clin Chem 2001; 4: 1147-56.
5. Sánchez M, Brugera M, Bosch J, Rodes J, Ballesta F, Oliva R. Prevalence of the Cys282Tyr and His63Asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary haemochromatosis and in control. J Hepatology 1998; 29: 725-8.
6. Hashem B, El-Serag HG, Inadomi JM, Kowdley KV. Screening for hereditary hemochromatosis in siblings and children of affected patients. Ann Intern Med 2000; 132 (4): 261-9.
7. Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JJ, Wittwer CT. Homogeneous Multiplex Genotyping of Hemochromatosis Mutations with Fluorescent Hybridization Probes. Am J Pathol 1998; 153: 1055-9.

3. Osteoporosis y genética

Dr. Jaime Ferrer Cañabate y Dr. Jaime Ferrer Cruz

Servicio de Análisis Clínicos. H.U. «Virgen de la Arrixaca»

Si parecía que con la publicación del genoma humano todas las incógnitas de lo más profundo del ser humano quedaban ya al descubierto, nada más allá de la realidad. No tenemos hasta ahora más que el extremo del hilo de una gran madeja que poco a poco vamos a tener que ir desenredando. El intento de encontrar soluciones terapéuticas a muchas de las grandes enfermedades que afectan al hombre, junto a la idea de llegar mucho más allá del simple conocimiento anatomofisiológico de éstas viene haciendo posible años acá conocer poco a poco, pero a grandes pasos, el alfabeto genético que codifica no sólo nuestro cuerpo y sus funciones sino también, entre otras muchas cosas, sus enfermedades. Una de ellas, y por desgracia claro ejemplo de enigma con muchas sombras, es la osteoporosis. Más de 1000 publicaciones acerca del estudio genético en el campo de la osteoporosis en las dos últimas décadas avalan la importancia del tema. Sin embargo, sorprende que esta búsqueda haya conducido a un gran número de resultados conflictivos y contradictorios, y por tanto a crear una gran confusión. La respuesta la encontramos en dos aspectos principales:

Hay tantos factores que afectan la masa ósea de una mujer posmenopáusica que una medida única en un momento determinado podría reflejar una gran variabilidad, consecuencia muchas veces de algo tan simple como el estilo de vida.

La naturaleza y frecuencia de los polimorfismos genéticos pueden ser distintas en distintas poblaciones, de manera que algunas variantes alélicas de un gen pueden ser muy prevalentes en determinadas poblaciones y estar ausentes en otras.

Si a todo esto unimos que las muestras analizadas en los distintos estudios no son las mismas, que el número de individuos estudiados suele ser pequeño, y que la imperiosa necesidad de buscar una respuesta quizás haya permitido salir a la luz estudios con escasa rigurosidad científica, al menos en cuanto a su material y métodos, nos encontramos inmersos en una vorágine de resultados no del todo satisfactorios.

La osteoporosis (caracterizada por una disminución de la masa ósea y un deterioro de la micro arquitectura del hueso con el consecuente aumento del riesgo de fractura) y el incremento de mortalidad, asociado a sus principales fracturas (vertebral, cadera y muñeca), tienen tal impacto que no pueden ser ignorados: el conocimiento de los factores genéticos heredables y su interacción con los medioambientales pueden ser las claves de una mejor prevención y el hallazgo de una terapia adecuada, hoy día prácticamente sólo paliativa.

Las estrategias más empleadas para el análisis de rasgos complejos, como es el caso de la osteoporosis, son el estudio de parejas de hermanos (analizando polimorfismos de marcadores genéticos, sobre todo empleando los microsátélites cuyos alelos se caractericen por tener diferentes longitudes en una secuencia de nucleótidos repetida) y los estudios de asociación (basados en el estudio de polimorfismos localizados en genes candidatos y su asociación con la masa ósea, riesgo de fractura).

Los mayores focos de atención y búsqueda son aquellos que determinan el pico de masa ósea, el remodelado y la pérdida de hueso. De todos ellos se conocen muchos factores

medioambientales que los alteran y/o regulan, pero no se conoce tanto acerca de qué gen regula tal o cuál característica. Los primeros estudios realizados atribuyen hasta un 60-80% de peso al componente genético de la masa ósea, pero nadie ha sido capaz de concluir hasta la actualidad qué gen es el principal responsable, por una razón que va siendo cada día más elocuente y que los análisis de segregación en familias han puesto al descubierto: no podemos hablar de un único gen responsable ni de pocos genes con grandes efectos, sino más bien de un complejo multifactorial de muchos genes con efectos modestos cada uno de ellos. Llegar a conocerlos todos no es la principal misión, sino más bien encontrar aplicación clínica a ese descubrimiento y ser capaces de poner en manos del clínico herramientas fiables para detectar grupos de riesgo, para entender las causas-efectos y para poder aplicar terapias que aporten soluciones definitivas al problema. El futuro debe estar encaminado, por tanto, no a conocer cualquier posible mutación o gen que pueda alterar mínimamente la masa ósea, sino a entender y aceptar la posibilidad de una variabilidad genética y explotar todos nuestros conocimientos para comprender la predisposición genética de cualquier individuo a enfermar y su posible respuesta o no a la terapia.

Son muchos los genes que hasta la actualidad se han propuesto como responsables en mayor o menor grado de afectación de la masa ósea. Los más importantes son:

1. **Gen del Receptor para la Vitamina D (VDR).** Morrison *et al*, encontraron una fuerte asociación entre determinados polimorfismos en este gen en estudios en gemelos, llegando a explicar hasta un 75% de la contribución genética a la masa ósea. Sin embargo, estudios posteriores encontraron resultados mucho menos concluyentes e incluso contrarios, debido a que las poblaciones de todos estos estudios estaban sesgadas por influencias distintas en función de distintos factores medioambientales (ingesta de calcio, niveles de vitamina D) y porque tales polimorfismos en dicho gen podían estar influenciados en unos individuos sí y en otros no por alteraciones en genes vecinos. Un estudio posterior encontró otro polimorfismo en el exón 2 del VDR que asociaba con la masa ósea en una población japonesa, pero no se ha visto corroborado con rotundidad en más estudios en distintas poblaciones.
2. **Gen del colágeno I α 1 (COLIA1).** Un primer polimorfismo hallado en el intrón 1 se asoció a diferencias en la densidad ósea, pero no se encontró tal relación o al menos no de tal intensidad en estudios posteriores. Sin embargo, hay algo que caracteriza a los polimorfismos en este gen: son los únicos que han sido asociados, al menos en varios estudios, al riesgo de fractura, aunque haya sido de una manera modesta y sin saber aún si se debe a efectos directos sobre la densidad mineral ósea (dmo) o sobre otro carácter fenotípico óseo. No debemos olvidar que son dos los genes que codifican el colágeno tipo I (COLIA1 y COLIA2), aunque son los polimorfismos Sp1 en el primero los más importantes (los heterocigotos G/T, llamados «Ss» tienen menor dmo en vértebra lumbar que los homocigotos G/G o «SS» y más aún que los homocigotos T/T o «ss»).
3. **Gen del receptor de estrógenos (ER).** Desde que se encontrara un fenotipo osteoporótico en un varón con una mutación en dicho gen, no han cesado los estudios del mismo. Sin embargo, aunque algunos de ellos han relacionado tanto RFLP (fragmentos de restricción de longitud polimórfica) en intrones como secuencias repetidas T/A con la densidad mineral ósea, otros similares no sólo no lo han confirmado, sino que lo han negado.
4. **Gen de la Interleukina-6.** La IL-6 juega un papel muy importante en la osteoclastogénesis y en la mediación de los efectos estrogénicos en el hueso, aunque no se ha encontrado asociación con la fractura osteoporótica.

5. **Gen del TGF- β 1 (Factor de crecimiento transformante β 1).** Con potentes efectos en la actividad tanto osteoclástica como osteoblástica, su liberación se estima que pueda ser un mediador del acoplamiento osteoclastos-osteoblastos. Se han encontrado polimorfismos en intrones del gen que lo codifica que se han relacionado con una muy baja dmo en pacientes osteoporóticos.
6. **Genes del sistema OPG/RANK/RANKL.** Nos encontramos quizás ante un complejo genético-molecular cuyo total esclarecimiento aún no ha visto la luz, al menos en cuanto a aplicaciones. RANKL, que actúa como ligando para la activación de RANKL, paso fundamental para una correcta osteoclastogénesis, es inhibido por un receptor señuelo como la osteoprotegerina, sintetizada por los osteoblastos maduros para frenar tanto la activación como la maduración osteoclástica. Aún casi en puertas de estudios genéticos de este complejo, no sólo puede abrir nuevas vías diagnósticas y terapéuticas con relación a la osteoporosis, sino a muchas otras enfermedades del tejido óseo (Paget, osteopetrosis, etc.).
7. **Otros genes candidatos:** De enzimas que degradan la matriz (catepsina K), de moléculas de adhesión celular (integrina β 3), de otras proteínas de la matriz ósea (osteocalcina) de calcitonina, del factor de crecimiento I tipo insulín-like, de la apolipoproteína E.

La búsqueda de genes relacionados en cierta medida de la masa ósea quizás no ha hecho más que comenzar, y cuando hay tantos candidatos, es que ninguno se merece el Oscar por unanimidad. Las vías, sin embargo, para encontrar soluciones y terapias con base genética a la osteoporosis pueden que sí estén ya sobre la mesa, o al menos en ciernes.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO Study Group. 1994 Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series 843. Geneva, Switzerland.
2. Nogués Solán X. Genética y osteoporosis. REEMO 2001 10(2):44-45
3. Salamone LM, Glynn NW, Black DM, Ferrell RE, Palermo L, Epstein RS, *et al.* Determinants of premenopausal bone mineral density: the interplay of genetic and lifestyle factors. J Bone Miner Res. 1996; 11(10):1557-65.
4. Krall EA, Dawson-Hughes B. Heritable and life-style determinants of bone mineral density. J Bone Miner Res. 1993; 8(1):1-9.
5. Harris M, Nguyen TV, Howard GM, Kelly PJ, Eisman JA. Genetic and environmental correlations between bone formation and bone mineral density: a twin study. Bone. 1998; 22(2):141-5.
6. Nguyen TV, Howard GM, Kelly PJ, Eisman JA. Bone mass, lean mass, and fat mass: same genes or same environments? Am J Epidemiol. 1998;147(1):3-16.
7. Gueguen R, Jouanny P, Guillemin F, Kuntz C, Pourel J, Siest G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. J Bone Miner Res. 1995; 10(12):2017-22.

8. Eisman JA. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev.* 1999; 20(6):788-804.
9. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, *et al.* Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature.* 1994; 367(6460):284-7.
10. Eisman JA. Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis: an affirmative view. *J Bone Miner Res.* 1995; 10(9):1289-93.
11. Garnero P, Borel O, Grant SF, Ralston SH, Delmas PD. Collagen Ialpha1 Sp1 polymorphism, bone mass, and bone turnover in healthy French premenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res.* 1998; 13(5):813-7.
12. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997; 89(2):309-19.
13. Gelb BD, Shi GP, Chapman HA, Desnick RJ. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science.* 1996; 273(5279):1236-8.
14. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Hosoi T, Inoue S, Kaneki M, *et al.* Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype. *J Bone Miner Res.* 1997; 12(9):1438-45.

4. Osteoprotegerina y sistema Rankl/Rank

Dr. Jaime Ferrer Cañabate y Dr. Jaime Ferrer Cruz

Servicio de Análisis Clínicos. H.U. «Virgen de la Arrixaca»

Dentro de algunos años, cuando miremos hacia atrás, nos daremos cuenta de la importancia que el estudio del metabolismo óseo ha tenido desde los ochenta hasta la actualidad, en concreto si nos referimos a la búsqueda de nuevos marcadores bioquímicos que ayuden tanto en el pronóstico como en el seguimiento y monitorización de terapias a instaurar, porque lo que hasta hoy día hemos de tener claro es que ningún marcador bioquímico de remodelado diagnostica enfermedades óseas tales como la osteoporosis. En toda esta vorágine comercial y clínica de investigación y desarrollo no sólo se han dirigido los estudios a la búsqueda de marcadores fiables en suero o en orina, sino que muchos grupos, bien directa o indirectamente, han buscado respuestas en el mapa genético humano.

En la última década, han sido grandes los avances en el entendimiento del mecanismo molecular que envuelve la regulación del remodelado óseo, centrándose muchos de estos estudios en las dos líneas celulares responsables de mantener la homeostasis del hueso. Por un lado la osteoclástica, resultado de la diferenciación de determinados progenitores hematopoyéticos, con los osteoclastos como responsables de la destrucción del hueso; y por otro la osteoblástica, derivada de células madre mesenquimales, con los osteoblastos como formadores de nuevo tejido óseo en aquellas zonas donde los primeros ya retiraron el material viejo. La necesidad de conocer el papel que desempeñan en todo el proceso de remodelado el gran número de citocinas, hormonas, factores de crecimiento, que se conocen actualmente están involucrados, ha llevado a descubrir todo un entramado molecular y genético que puede o no llegar a ser, aún es pronto para decirlo, la clave en el conocimiento de todo el complejo molecular que entra en juego cada vez que tiene lugar cualquier etapa del ciclo de remodelado.

La pregunta estaba en el aire: totalmente demostrado que los osteoclastos retiran hueso viejo y que los osteoblastos rellenan los huecos dejados con material nuevo, pero ¿quién coordina esas actuaciones? ¿quién indica a los osteoclastos dónde y cuándo han de empezar a actuar? ¿quién es el responsable primero o último en la coordinación de todo el remodelado? Quizás no se puedan contestar estas y otras preguntas similares aún con rotundidad, pero al menos parece que ya sí conocemos algunas respuestas basadas en el descubrimiento del sistema Osteoprotegerina-RANK-RANKL.

En primer lugar, dos grupos distintos, uno estudiando cDNAs en intestino de rata y otro buscando factores de inhibición/estimulación de los osteoclastos, descubrieron la osteoprotegerina (OPG, «to protect bone»), miembro de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNRF), que a diferencia de sus parientes no permanece anclada en membrana, siendo secretada y pudiendo ejercer su acción en un lugar distinto al de su síntesis. Se vio que era una proteína con una potente actividad inhibitoria de la osteoclastogénesis, pero se desconocía cómo ejercía esta función. Posteriormente, aparecieron los otros componentes: el ligando RANKL (también conocido como OPG-L, ODF) y el receptor RANK (Receptor Activador de NF- κ B). RANKL aparece anclado en la membrana de osteoblastos, células del estroma, células inmaduras mesenquimales de los

bordes del cartílago y condrocitos hipertróficos, o bien es liberado en forma de moléculas homotrímeras. El receptor RANK se encuentra en células de la estirpe monocito-macrófaga, en células T y B, en preosteoclastos, fibroblastos y células dendríticas. La interacción RANK-RANKL inicia la diferenciación y maduración de los precursores de osteoclastos, que se activan iniciando el proceso de reabsorción. La osteoprotegerina se une al RANKL, bloqueando su interacción con RANK e inhibiendo el desarrollo de la serie osteoclástica, y como consecuencia, frena o inhibe la resorción ósea.

Parece probado que no son, pues, los osteoclastos los que realmente inician el ciclo de remodelado, sino que son los osteoblastos los que indican a los primeros dónde, cuándo y hasta cuándo deben reabsorber hueso, para a continuación ellos proceder a la neoformación. Parece en cierta medida lógico; de hecho, mientras los osteoblastos maduros producen grandes cantidades de osteoprotegerina como receptor señuelo de RANKL, con el fin de bloquear la osteoclastogénesis e impedir la formación de osteoclastos que podrían destruir si no son controlados incluso el hueso recién formado, son los osteoblastos inmaduros los encargados de reclutar a los osteoclastos mediante descensos en la expresión de OPG e incrementos en la de RANKL.

Estas, en principio, hipótesis quedaron contrastadas en parte cuando se iniciaron los primeros estudios en animales. Los ratones OPG-Knock-out presentaban mayor tasa de mortalidad y de fracturas vertebrales y femorales, con un índice de remodelado exagerado, e incluso calcificaciones muy tempranas en la aorta (a las 2 semanas de vida). Los ratones RANKL-knock out padecían por el contrario osteopetrosis severa, con defectos en la erupción dental y ausencia de nódulos linfáticos, fallos en la diferenciación de las células T y B, fallos en la formación estructural lóbulo-alveolar de las mamas... Y los ratones deficientes en el receptor RANK, como cabía esperar, presentaban severa osteopetrosis y similares patologías a los ratones RANKL-Knock out.

La pregunta que debemos formularnos hoy día es clara: ¿podremos encontrar utilidad en este hallazgo, de cara a tratar enfermedades como la osteoporosis, artritis reumatoide? ¿son extrapolables los hallazgos encontrados en animales a los humanos? Ya existen estudios donde aparecen descensos reflejados en los marcadores de resorción cuando se administra OPG en mujeres postmenopáusicas, se intenta explicar la distinta actuación de la PTH en función de su concentración en base a su afectación sobre la ratio OPG/RANKL, e incluso se empieza a encontrar relación al deterioro óseo ligado a determinadas leucemias u otras enfermedades donde el sistema inmunológico desempeña un papel preponderante.

Parece claro que, aunque quizás las expectativas creadas no satisfagan definitivamente a todos, si ayudara, esperamos una pronta resolución y conocimiento pleno de todo este sistema, al menos, para entender mejor cómo funcionan nuestros huesos, por qué enferman y hasta dónde seremos capaces de remediarlo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev.* 1996 Aug; 17(4):308-32.
2. Kostenuik PJ, Shalhoub V. Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr Pharm Des.* 2001 May; 7(8):613-35.

3. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18; 89(2):309-19.
4. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, *et al.* Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*. 1998 Mar; 139(3):1329-37.
5. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998 Apr 17; 93(2):165-76.
6. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Mar 31; 95(7):3597-602.
7. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999 Jan 28; 397(6717):315-23.
8. Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaja M, *et al.* TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell*. 1999 Dec; 4(6):1041-9.
9. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, *et al.* RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 Feb 15; 97(4):1566-71.
10. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001 Dec; 142(12):5050-5.
11. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med*. 1995 Feb; 332(5):305-11.

5. *Legionella pneumophila*

Dra. María Dolores Navarro Martínez y Dra. Francisca Eugenia Fornés Riera

Servicio de Microbiología. H.U. «Virgen de la Arrixaca»

La significación médica del género *Legionella* fue por primera vez reconocida después de una epidemia de neumonía entre miembros de la legión americana participantes de una convención en Philadelphia (1976). Sin embargo, se sabe que esa bacteria desconocida ya había provocado brotes epidémicos anteriormente, y que 30 años antes se había aislado, aunque nunca se pudo identificar, considerándose como organismos «rickettsia-like».

5.1. Taxonomía

Este nuevo organismo originó una nueva familia (*Legionellaceae*), así como un nuevo género (*Legionella*), con diferentes especies, unas 40, de ellas 19 aisladas en humanos, y entre las que se encuentran algunas como *L. pneumophila*, *L. micdadei* o *L. bozemanii*. Dentro de la especie *L. pneumophila*, se han descrito tres subespecies distintas: *fraseri*, *pascullei*, y *pneumophila*, de la que existen 15 serogrupos, dentro de los cuales el 1, sobre todo, y el 4 y 6 tienen la mayor significación clínica.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales ha permitido reconocer la diversidad genética de individuos del mismo serogrupo. Así, para el 1 se distinguen los subgrupos en función de su reactividad con distintos anticuerpos, tabla 1 (Joly *et al.*).

5.2. Características morfológicas y fisiológicas

Los miembros de la familia *Legionellaceae* son bacilos débilmente Gram negativos, no esporulados, de 0,3 a 0,5 μm por 1,5 a 5 μm , filamentosos en cultivo. Son aerobios, aunque su crecimiento se ve favorecido con tensiones de CO_2 del 2 al 5%. La mayoría de ellos, incluido *L. pneumophila*, son catalasa y gelatinasa positiva y móviles por uno o varios flagelos polares o subpolares. Ésta además hidroliza el hipurato y produce un pigmento marrón difusible.

Son organismos nutricionalmente exigentes que requieren para su aislamiento medios tamponados (pH: 6,9), con carbón activo como detoxificante, L-cys, y sales de hierro, (BCYE α ó BCYE α suplementado con antibióticos).

En estos medios, la bacteria crece a las 48-72 h, dando colonias lisas, iridiscentes y de bordes característicos que asemejan cristales rotos.

5.3. Ecología

Legionella spp está extendida en el medio ambiente, asociada casi exclusivamente a zonas húmedas, ríos, lagos, así como aguas potables. En este caso, la fuente suele ser grifos, duchas, fuentes públicas, torres de refrigeración.

Puede sobrevivir en un amplio rango de condiciones ambientales (temperatura de 0-63 °C, pH:5-8,5). El factor más importante para la supervivencia de *Legionella spp* en el medio ambiente es la presencia de amebas de vida libre, dentro de las cuales se multiplica.

La colonización de los sistemas de distribución de aguas por la bacteria depende, por tanto, de varios factores que incluyen la temperatura del agua, la acumulación de sedimentos y la presencia de microbiota comensal.

5.4. Modo de transmisión

La forma de transmisión de la bacteria a humanos es múltiple, siendo la más frecuente la inhalación de aerosoles. También es posible el contagio por la aspiración de aguas contaminadas, el contacto de éstas con heridas o la ingestión de la bacteria. Se ha documentado, además, en algún caso de parto acuático la infección del recién nacido.

5.5. Incidencia

La incidencia de la enfermedad depende del grado de contaminación del reservorio acuático, la susceptibilidad de las personas expuestas y la intensidad de exposición.

El consumo de cigarrillos, las enfermedades pulmonares crónicas, la edad avanzada y la inmunosupresión son consideradas como importantes factores de riesgo. En algunos estudios también se ha implicado la excesiva ingesta de alcohol y fallos renales.

La cirugía es el mayor factor predisponente en neumonía nosocomial y los transplantados, los enfermos de mayor riesgo.

El espectro de la enfermedad se ha ampliado también a niños, presentándose sobre todo como neumonía nosocomial en neonatos y niños inmunodeprimidos.

5.6. Formas clínicas

La infección por *Legionella* se manifiesta en dos formas muy distintas:

- 1. Fiebre de pontiac**, es un cuadro agudo pseudogripal y autolimitado sin neumonía. El período de incubación es de 24 a 48 h, y afecta a más del 90% de los expuestos. La radiografía de tórax es normal. El tratamiento es sintomático y suele resolverse en una semana.
- 2. Enfermedad de los legionarios**, su presentación es variada, desde tos con ligera fiebre a estupor con múltiples infiltrados pulmonares y fallo multisistémico. El período de incubación suele ser de 2 a 10 días. La tos es poco productiva y el esputo en ocasiones puede ser algo sanguinolento, aunque no hemoptoico. En un 20% de casos se puede presentar diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal. Los síntomas neurológicos son bastante comunes y van desde cefalea y letargia a encefalopatía.

Presentan frecuentemente hiponatremia. En pacientes inmunodeprimidos se pueden dar afectaciones extra-pulmonares del tipo de celulitis, sinusitis, abscesos perirrectales,

pielonefritis, peritonitis, pancreatitis, pericarditis y endocarditis. Se han observado bacteriemias después de la infección de heridas por la bacteria.

5.7. Diagnóstico de laboratorio

Hay tres aproximaciones diagnósticas en la infección por *Legionella*:

1. La búsqueda del microorganismo en sus distintas localizaciones.
2. La detección de antígenos de la bacteria que son eliminados por la orina
3. Determinaciones serológicas de anticuerpos contra la bacteria.

Ninguno de estos métodos por separado consigue una sensibilidad del 100%. Lo más acertado es utilizarlos todos para conseguir un mejor diagnóstico, sobre todo en brotes epidémicos.

5.7.1. Toma de muestras

Es adecuado el esputo, tanto natural como inducido. También son adecuadas las muestras obtenidas por broncoscopia y los lavados broncoalveolares donde el rendimiento suele ser mayor. Se deben procesar rápidamente, aunque se puede aislar el germen incluso tras varios días de almacenamiento a temperatura ambiente.

En enfermos con cuadros graves y generalizados puede ser útil el hemocultivo, aunque su rendimiento es bajo. Se deben obtener muestras de sangre para realizar determinaciones serológicas en el momento agudo de la enfermedad y en el período de convalecencia a las 3-4 semanas y muy recomendable a las 6-10 semanas. Para las pruebas rápidas de detección de antígeno, se requerirán muestras de orina.

5.7.2. Detección directa y aislamiento de la bacteria

La presencia de la bacteria se puede poner de manifiesto mediante la tinción de Gram con fucsina básica como colorante de contraste, aunque el rendimiento es muy bajo por la poca afinidad de la bacteria por el colorante. Son bacilos finos y pálidamente teñidos como Gram negativos y siempre hay que confirmar su existencia mediante cultivo en medios selectivos.

Con una tinción con anticuerpos fluorescentes frente a la bacteria, y más aún si son monoclonales, se obtiene una mayor sensibilidad (33-70%) y sobre todo una mayor especificidad (96-99%).

También se puede realizar una amplificación de material genético de la bacteria mediante técnicas de biología molecular como la PCR, aunque no es más sensible que el cultivo.

El aislamiento de la bacteria es el método definitivo de diagnóstico de infección por *Legionella*, aunque su sensibilidad es realmente variable dependiendo de varios factores, entre ellos la dificultad de crecimiento de la bacteria, la calidad de la muestra y de su procesamiento, la gravedad del enfermo y la situación epidemiológica, ya sea un caso aislado, un brote nosocomial o un brote epidémico a mayor escala.

Las muestras se procesan para eliminar la mayor cantidad de flora acompañante, valiéndose de la capacidad de *Legionella spp* de resistir condiciones extremas de pH y temperatura; se acidifican las muestras o se calientan a 60 °C durante 2'. El cultivo se realiza en medios selectivos para *Legionella* (BCYE α ó BCYE α suplementado con antibióticos) y paralelamente en agar sangre para ayudar a descartar falsas colonias sospechosas. Los antibióticos adicionados son aquellos a los que la bacteria es intrínsecamente resistente, como polimixina B, anisomicina, cefamandol o vancomicina.

Se incuba a 35-37 °C en atmósfera de 2-5% de CO₂ y se observan a las 48-72 h e incluso 96 h, realizándose de las colonias sospechosas subcultivos paralelos en medio selectivo y en agar sangre.

La identificación de las especies y serogrupos patógenos más comúnmente aislados (*L. pneumophila* SG 1 y 6, *L. micdadei* o *L. dumoffi*) se puede hacer mediante técnicas de aglutinación o inmunofluorescencia directa, ya que bioquímicamente no se puede llegar a una buena diferenciación. De cualquier forma, la identificación definitiva de los aislados sólo se puede llevar a cabo en laboratorios de referencia con la ayuda de métodos genéticos.

Una última tendencia propone aislar la bacteria por centrifugación de cultivos celulares en Shell Vial, como se hace con otras bacterias intracelulares.

5.7.3. Antigenuria

La detección de un antígeno polisacárido de la pared celular de *L. pneumophila* SG 1 en orina ofrece una buena sensibilidad (aprox. 70%) y una muy elevada especificidad, que permite el diagnóstico temprano de la infección. Este antígeno empieza a aparecer en orina en el momento agudo de la enfermedad, aunque en algunos casos puede tardar unas 48 h, y puede ser detectado incluso más de un mes después. Aunque estas técnicas sólo son útiles para el antígeno del serogrupo 1, son de gran utilidad ya que éste es el responsable de más del 80% de los casos de infección pulmonar.

La antigenuria se puede detectar con varios métodos, como el enzimoimmunoensayo. Para mejorar el rendimiento se pueden someter las orinas a centrifugación y posterior concentración con filtros. El calentamiento previo a 100 °C durante unos 3-5', aumenta la especificidad de la técnica, ya que elimina sustancias que podrían dar falsos positivos.

5.7.4. Técnicas serológicas

Son útiles para estudios epidemiológicos de prevalencia y como complemento de las otras técnicas. Sus desventajas radican principalmente en su carácter generalmente retrospectivo y la existencia de reacciones cruzadas entre las distintas especies de *Legionella* y otras bacterias como *Campylobacter jejuni*, *P. aeruginosa*, *B. pertussis*, *C. freundii*, etcétera.

Existe gran variedad de técnicas (Elisa, Contrainmunolectroforesis, Microaglutinaciones, etc.), aunque de referencia es la inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Los anticuerpos que la respuesta inmunológica produce, son de clase IgG, IgM e IgA en menor cantidad. Es por eso importante utilizar anti-inmunoglobulinas contra las tres clases de anticuerpos, si bien en algunas ocasiones se han utilizado únicamente anti-IgM para tratar de dar un diagnóstico serológico temprano. La IgM puede permanecer detectable en

suero durante varios meses, por lo que no serviría como marcador de infección aguda. La infección por *L. pneumophila* se caracteriza por originar una seroconversión tardía en un 15% de los infectados, por lo que es necesario obtener muestras en el momento agudo, a las 3-4 semanas y a las 6-10 semanas, incluso se ha podido observar algún porcentaje de seroconversión más allá de la semana 11, por lo que una cuarta muestra no sería inadecuada en casos de elevada sospecha. El criterio de seroconversión más aceptado es el de un incremento desde cuatro veces el título de anticuerpos hasta al menos 128 en dos muestras consecutivas, aunque también se considera presuntivamente positiva una única muestra con un título de al menos 1/256; cantidad que se considera no se encontraría en población sana por el mero hecho de haber tenido contacto con la bacteria.

En líneas generales, la sensibilidad de estas técnicas es del 70-80%, y su especificidad del 95-99%, dependiendo de la incidencia de infección en la zona.

5.8. Susceptibilidad antimicrobiana y tratamiento

La susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* no se correlaciona bien con la respuesta clínica, por lo que no son aconsejados los antibiogramas.

En formas leves, se aconseja la administración de eritromicina 2-4 g/día oral, de 10 a 14 días, o azitromicina 500 mg/día oral, 3 días.

Para formas graves, neumonía cavitada o paciente inmunodeprimido, una fluorquinolona (levofloxacin 500mg/día i.v.) 14 días o eritromicina 1g/6h i.v. con rifampicina 600 mg oral o i.v. 14-21 días. Como alternativa, doxiciclina o cotrimoxazol a dosis altas.

Tabla 1: Subgrupos de *L. pneumophila* SG 1 (Joly *et al.* 1986).

SUBGRUPO MAYOR	SUBGRUPO MENOR
Pontiac	Philadelphia
	Allentown
	Benidorm
	Knoxville
	France
Olda	OLDA
	Oxford
	Heysham
	Camperdown
Bellingham	Bellingham

BIBLIOGRAFÍA

1. Murray PR, Baron J, Pfaller FH, Tenover J, Tenover Y. Manual of Clinical Microbiology, 7 Ed. 1999. Washington D.C. ASM Press.
2. Mandell HJ, Douglas PD, Bennett's H. Principles and Practice of Infectious Diseases 5 Ed. 2000.
3. Edelstein PH. Legionnaires' Disease. Clin Infect Dis 1993; 16:741-9.
4. Stout JE, Yu VL. Current concepts: Legionellosis. N Eng J Med 1997; 337:682-7.
5. Joly JR, McKinney RM, Tobin JO'H, Bibb WF, Watkins ID and Ramsay D. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1986; 23:768-71.
6. La Scola B, Michel G, Raoult D. Isolation of *Legionella pneumophila* by centrifugation of Shell Vial cell cultures from multiple liver and lung abscesses. J Clin Microbiol 1999; 37:785-7.
7. Kohler RB, Winn WC, Joseph L. Wheat Onset and duration of urinary antigen excretion in legionnaires disease. J Clin Microbiol 1984; 20:605-7.
8. Domínguez JA, Manterola JM, Blavia R, *et al.* Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and concentrated urine by selective ultracentrifugation. J Clin Microbiol 1996; 34:2334-6.
9. Padilla I, Masiá M, Carratalá JA, Shum C. Seroconversión tardía en la neumonía por *Legionella pneumophila*. Revista Clínica Española 1993; 192:66-7.
10. Mensa J, Gatell, Jiménez de Anta, Prats. Guía de Terapéutica Antimicrobiana 2002. 12 Ed. Barcelona. Masson.

6. Bases moleculares del linfoma

Dra. Lucía García Mancebo, Dra. Teresa Agulló Ortuño y Dr. Francisco Cañizares Hernández
Laboratorio de hormonas. Servicio de Análisis Clínicos. H.U. «Virgen de la Arrixaca»

6.1. Introducción

El avance en el conocimiento de los aspectos biológicos implicados en el desarrollo de las neoplasias en general, y de los linfomas en particular, ha permitido definir mejor los diferentes tipos de linfoma y comprender la historia natural de los mismos, con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Cada día son más conocidas las alteraciones citogenéticas que generan la transformación neoplásica de una célula linfoide. Estas alteraciones se traducen a nivel molecular en la activación de determinados protooncogenes y genes supresores, que actúan sobre el ciclo celular, favoreciendo fenómenos de proliferación o bien bloqueando la apoptosis o muerte celular programada. Cada una de estas alteraciones citogenéticas se suele asociar a un tipo de síndrome linfoproliferativo (SLP) e implica a un mecanismo molecular concreto.

6.2. Tipos de alteraciones citogenéticas

Las traslocaciones presentes en los linfomas suelen afectar al gen de las cadenas pesadas (IgH) o ligeras de las inmunoglobulinas, que es yuxtapuesto a otro oncogen, generalmente encargado de la producción de una proteína, produciendo una desregulación de este último gen, con sobre expresión de la proteína producto del mismo, por ejemplo t(14;18), t(11;14).

Menos característico de los linfomas es la fusión de dos genes como producto de la traslocación, por ejemplo t(2;5), t(9;22) o la aparición de deleciones con pérdida de genes con función «supresora» o reguladora sobre la función de otros, como p 53 o p16.

6.3. Técnicas del estudio genético

- 1. Citogenética:** Estudio de las alteraciones cromosómicas en la metafase de la célula neoplásica. Técnica muy laboriosa, difícilmente automatizable y que precisa de tejidos en fresco con suficiente celularidad y elevada proliferación celular. En los linfomas suelen presentar cariotipos complejos con varios clones diferentes y con múltiples alteraciones asociadas a la traslocación primaria, por lo que aumenta la dificultad técnica.
- 2. FISH (fluorescencia con hibridación *in situ*):** Se basa en la hibridación de una sonda de ADN marcada con una sustancia fluorescente sobre su secuencia complementaria del genoma celular. Emplea tejidos frescos y congelados. Esta técnica aumenta la probabilidad de detectar anomalías cromosómicas en células neoplásicas con bajo porcentaje de proliferación. Su uso es limitado por la disponibilidad de sondas de ADN.
- 3. PCR:** Sus ventajas son la sensibilidad, precisión y rapidez, permitiendo la identificación de anomalías complejas, no reconocidas con otras técnicas, y la utilización sobre cualquier tipo de tejido fresco, congelado e incluso ya teñido. El clonaje y la secuenciación de los

oncogenes alterados por las traslocaciones primarias de los SLP permite el estudio del ADN y ARN tumoral mediante las técnicas de PCR reversa (RT-PCR) y Southern blot. Estos métodos son indispensables para el diagnóstico y monitorización terapéutica de los SLP. RT-PCR se emplea rutinariamente para el estudio de varias traslocaciones como la t(14;18), t(11;14), t(2;5) y t(9;22), no estando disponible para todos los reordenamientos.

4. **Southern blot:** Más lenta y menos sensible que la PCR, pero se prefiere a ésta para el estudio de genes de gran tamaño con puntos de ruptura variables o genes muy promiscuos (BCL6, C-myc).

6.4. Aplicaciones del análisis molecular

1. **Diagnóstico:** La evaluación por métodos moleculares de las distintas traslocaciones puede, algunas veces, ser usada como una herramienta para distinguir un tipo de linfoma de otro. Entre otras, por ejemplo, t(14;18) y t(11;14) distingue el linfoma centro-folicular del linfoma del manto de crecimiento nodular; t(2;5) se asocia con linfoma anaplásico y lo distingue de lesiones que pueden parecer similares, como papulosis linfomatoide y linfoma de Hodgkin's borderline, etc.
2. **Pronóstico:** Junto con su valor diagnóstico, la detección de algunas lesiones moleculares proporciona importantes datos pronósticos. Los pacientes de alto riesgo reciben tratamientos más agresivos y, por el contrario, es muy importante identificar a los pacientes con menor riesgo de recidiva para minimizar los efectos adversos de una terapia agresiva innecesaria y tóxica. La presencia de BCL-1 en el linfoma del manto está asociada a una supervivencia media corta y un curso clínico agresivo. Sin embargo, en general, este tipo de LNH tiene un pronóstico relativamente pobre. Puede ser importante detectar el BCL-6 en pacientes con linfoma difuso de células grandes porque su presencia se asocia con un pronóstico relativamente favorable. Similarmente ocurre con la detección de NPM/ALK y buen pronóstico en los linfomas anaplásicos.
3. **Evaluación de la enfermedad mínima residual (EMR):** Presencia de un clon residual de células malignas que es indetectable con los criterios morfológicos convencionales, pero que puede ser demostrado con técnicas más sensibles, incluyendo citometría de flujo y análisis molecular (PCR). La detección por PCR tras altas dosis de quimioterapia, antes del trasplante de médula ósea es clínicamente significativa en una variedad de LNH, con una alta probabilidad de recaída en el linfoma folicular y del manto.

La evaluación de EMR por PCR es importante para la clínica y el pronóstico en el contexto del auto trasplante de células madre de sangre periférica y médula ósea en la terapia de los linfomas. Numerosos estudios han mostrado que la reinfusión de las células malignas recogidas desprovistas de clones malignos por PCR detectable puede ser crítica en mantener un estatus PCR-negativo tras el trasplante. La reinfusión de las células recogidas PCR negativa tras un tratamiento *in vitro* se correlaciona con la persistencia de PCR negativa y es predictivo de una supervivencia prolongada libre de enfermedad.

El análisis citogenético y molecular tiene escaso valor diagnóstico en el linfoma de Hodgkin's, salvo en los casos de duda en el diagnóstico histológico. Las deleciones de 4q detectadas en algunos pacientes con LH son de especial interés ya que no se han descrito asociadas a ningún otro SLP.

A pesar del atractivo del estudio molecular, el abordaje diagnóstico de un paciente con un linfoma precisa, en muchas ocasiones, una evaluación del cariotipo previa que determinará qué región cromosómica estudiaremos con FISH o PCR.

Tabla 1: Distribución y frecuencia de las distintas alteraciones citogenéticas en los diversos grupos de linfomas no-Hodgkin's.

Histología	Traslocación	Genes	(%)	Método
Linfoma de células B				
Centro folicular	t(14;18)(q32;q31)	IgH-BCL2	90	PCR
Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	MYC-IgH	75	Southern blot
	t(2;8)(q12;q24)	IgL-MYC	16	Southern bot
	t(8;22)(q24;q11)	MYC-IgI	9	Southern blot
Células del manto	t(11;14)(q13;q32)	BCL1-IgH	70	
Linfoplasmocitoide	t(9;14)(p13;q32)	PAX5-IgH	50	PCR
Difuso células grandes	t(3q27)	BCL6	40	Southern blot
Marginal	t(11;18)(q21;q21)		35	
Linfoma de células T				
Anaplásico	t(2;5)(p23;q35)	NPM-ALK	35	RT-PCR

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; RT-PCR: PCR-reversa.

BIBLIOGRAFÍA

- Gaidano G, Dalla-Favera R. Molecular biology of lymphoid neoplasms. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. *The Molecular Basis of Cancer Philadelphia* WB Saunders Co 1995; pp:18-37.
- Offit K, Chaganti RSK. Chromosomal aberrations in non-Hodgkin's lymphoma: biological and clinical correlations. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5:853.
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nuclear protein gene, NMP, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; 263:1282.
- Taniwaki M, Matsuda F, Jauch A, et al. Detection of 14q32 translocations in B-cell malignancies by in situ hybridization with yeast artificial chromosome clones containing the human IGH gene locus. *Blood* 1994; 83:2962-9.
- Croce CM: Molecular biology of lymphomas. *Semin Oncol* 1993; 20 (Suppl 5):31-46.
- Crisan D, Chen ST, Weil SC. Polymerase chain reaction in the diagnosis of chromosomal breakpoints. *Hematol Oncol Clin Noth Am* 1994; 8:725-50.
- Popescu NC, Zimonjic DB. Molecular cytogenetic characterization of cancer cell alterations. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93:10-21.
- Andersen NS, Donovan JW, Borus JS, et al. Failure of immunologic purging in mantle cell lymphoma assessed by polymerase chain reaction detection of minimal residual disease. *Blood* 1997; 90:4212-4221.
- Wu GQ, Sharp JG, Wu G, et al. The detection of minimal lymphoma by molecular and combined culture molecular methods. *Br J Haematol* 1997; 99:873-81.
- Corradini P, Astolfi M, Cherasco C, et al. Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell non-Hodgkin's lymphomas treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. *Blood* 1997; 89:724-731.

7. Pepsinógeno

Isabel Macizo Soria, Soledad Parra Pallarés, Begoña Cerdá Martínez-Pujalte y Pedro Martínez Hernández

Servicio de Análisis Clínicos. H.U. «Virgen de la Arrixaca»

7.1. Introducción

Los enzimas proteolíticos se consideran involucrados en el desarrollo de procesos tumorales debido a su papel en la degradación de la matriz extracelular que facilitaría la invasión tumoral y metástasis (1). Muchos estudios demuestran que una variedad de enzimas proteolíticos están sobreproducidos, bien por las células cancerosas por sí mismas, o bien por el estroma de las células del huésped (2). Estas proteasas incluyen matriz-metaloproteinasas tales como gelatinasas, proteasas séricas (activadores del plasminógeno), cisteínproteasas (catepsinas B y L) y aspartatoproteasas (catepsina D). Varios estudios clínicos demuestran que la sobreexpresión de estas proteasas en los procesos tumorales se asocia generalmente con un pronóstico clínico desfavorable (3).

Los pepsinógenos humanos (PGs: PGA y PGC) son aspartato proteasas producidos en la mucosa gástrica y secretados al lumen que desempeñan un papel principal en la digestión de proteínas. Diversos autores les han atribuido el papel de marcador tumoral, habiéndose encontrado un descenso de PGA y de la ratio PGA/PGC en pacientes con gastritis atrófica (4) o cáncer gástrico (5).

La medida sérica del pepsinógeno se considera un marcador bioquímico no invasivo de monitorización de la secreción péptica y un método bioquímico eficaz de evaluación y monitorización de pacientes con enfermedades gastrointestinales (6), así como un parámetro capaz de valorar la eficacia de tratamientos farmacológicos destinados a erradicar el *Helicobáctter pylori* (7).

7.2. Aspectos bioquímicos

El pepsinógeno es una aspartato proteasa secretada por las células principales y mucosas del cuello del fundus gástrico, por las glándulas pilóricas del antrum y por las glándulas de Brunner en el duodeno proximal; es un proenzima que se transforma en pepsina (principal proteasa ácida en la luz gástrica) en presencia del pH ácido del estómago.

Consta de una simple molécula polipeptídica de PM aproximado 42.000 Da, cuya síntesis y secreción está regulada por mecanismos feed-back. En estado de reposo se almacena en gránulos inhibiendo así síntesis posteriores. El estímulo secretor incluye dos mecanismos: uno envuelve el cAMP como mediador y el otro se relaciona con una modificación de la concentración intracelular del Ca^{2+} .

Según sus caracteres inmunohistoquímicos, los pepsinógenos se clasifican en:

- Pepsinógeno I (PGA) (PG I): único detectado en orina. Además de en las células principales, aparece en células mucosas de cuerpo y fundus.
- Pepsinógeno II (PGC) (PG II): se encuentra en los mismos puntos que el PG I y también en mucosas cardial y pilórica, y en las glándulas de Brunner.

Puede ser detectado en suero, jugo gástrico y orina. El análisis consiste en una determinación cuantitativa de PG I y PG II que utiliza fluorimetría como técnica de detección e inmunoensayo doble sándwich: anticuerpos monoclonales contra pepsinógeno C frente a antígeno purificado aislado de mucosa gástrica (8).

7.3. Significación clínica

Los niveles séricos varían en desórdenes tales como úlcera duodenal, úlcera gástrica, Zollinger-Ellison, gastritis atrófica, anemia perniciosa, metaplasia intestinal y carcinoma gástrico. De ellas, tres están relacionadas con la incidencia de la infección por *H. pylori* (u. duodenal 95%, u. gástrica 70% y carcinoma gástrico 80%).

Tabla I: Patologías digestivas relacionadas con el Pepsinógeno.

HELICOBÁCTER PYLORI	<ul style="list-style-type: none"> * Principal causa de gastritis crónica B. * No se relaciona con la gastritis A autoinmune. * Puede producir un cuadro de dispepsia y gastritis aguda. * Revierte con tratamiento antibiótico.
GASTRITIS CRÓNICA TIPO B	<ul style="list-style-type: none"> * Inflamación de la mucosa gástrica. * Evolución hacia una gastritis crónica atrófica. * Va desapareciendo el componente glandular.
ÚLCERA PÉPTICA	<ul style="list-style-type: none"> * Enfermedad producida por exceso de jugo gástrico que sobrepasa la capacidad defensiva de la mucosa.
CÁNCER GÁSTRICO CG	<ul style="list-style-type: none"> * Estadio final de lesiones ulcerosas con desestructuración del componente glanduliforme.

1. Infección por *Helicobáctér pylori*

La infección de la mucosa gástrica por *H. pylori* es un factor indudable en la etiopatogenia de los dos procesos más frecuentes del tracto digestivo superior, gastritis crónica B o ambiental y enfermedad ulcerosa, e incluso existe una posible relación con la enfermedad maligna.

PG I y PG II aparecen elevados en los pacientes infectados por *H. pylori* (PG II se eleva en mayor proporción que PG I) y el cociente PG I/PG II disminuye en estos enfermos.

PG ha demostrado ser un buen indicador del fracaso/éxito de la terapia de erradicación del *H. pylori* (9).

2. Gastritis crónica

Se caracteriza por inflamación de la mucosa acompañada o no de alteración de la arquitectura glandular, dependiendo de la intensidad del proceso. En la gastritis crónica atrófica, el proceso inflamatorio se extiende en profundidad afectando las glándulas gástricas. Dado que los niveles de **pepsinógeno** reflejan el estado morfológico y funcional de la mucosa gástrica, su medida es un parámetro bioquímico de utilidad como marcador de gastritis crónica atrófica (GCA).

Esta patología ha sido considerada como precursora de carcinoma gástrico (CG) habiéndose estimado que un 10% de pacientes con GCA desarrollarán CG en 10-15 años (10).

El papel de la infección por *H. pylori* con desórdenes gastrointestinales, e incluso su relación con el cáncer gástrico, no se pone ya en discusión (11), aunque no están dilucidadas las razones por las que del gran porcentaje de la población con la infección gástrica por el bacilo espiral sólo unos pocos son susceptibles al desarrollo de tales complicaciones.

La presencia del gen Cag-A y de su producto proteínico Cag-A, en cepas de *H. pylori*, incrementa el riesgo de sufrir gastritis atrófica, así como la severidad de la lesión (12).

La respuesta inmune contra Cag-A desencadena una severa infiltración de la mucosa por neutrófilos polimorfonucleares, y la presencia de anticuerpos contra esta proteína se asocia con elevación de los niveles séricos de pepsinógeno (13).

En estadios de gastritis superficial PG I y PG II están elevados (PG II se eleva en mayor proporción que PG I) (Tabla II).

En estadios más avanzados de atrofia media/moderada, el PG I se mantiene similar al anterior y el PG II sufre una elevación.

En el último estadio, gastritis crónica atrófica severa, el PG I disminuye, el PG II se mantiene elevado y el cociente PG I/PG II disminuye.

De todo lo anterior se deduce que el aumento de la severidad de la gastritis está asociado con alteraciones no paralelas en los niveles de PG I y PG II, aunque el cociente PG I/PG II en combinación con el PG I urinario sí pueden ser predictores del estado histológico de la mucosa gástrica (14).

3. Úlcera péptica

Define un grupo de enfermedades ulcerosas de los tramos altos del aparato gastrointestinal (estómago y porción proximal del duodeno), que tienen en común la participación de ácido y pepsina en su etiopatogenia. Asimismo, se utiliza el término de referencia a úlceras gástricas o duodenales asociadas con estrés o ingestión de fármacos.

La mucosa inflamada crónicamente es más susceptible a la lesión ácida péptica y, por tanto, más proclive a la ulceración.

Se ha encontrado una relación entre la infección por *H. pylori* y el nivel de pepsinógeno I en el suero de estos pacientes.

4. Carcinoma gástrico

A pesar de que la incidencia del carcinoma gástrico en los países industrializados ha disminuido, continúa siendo el segundo cáncer en el mundo por orden de frecuencia de presentación (14) con un pronóstico infausto cuando se detecta en etapas avanzadas. En menores de 40 años es extremadamente raro, teniendo un pico de máxima incidencia en la 7.^a década de la vida, y por sexos es el doble de frecuente en varones (15).

Actualmente ha disminuido la incidencia de su presentación distal (cuerpo y antro) ha aumentado su localización proximal [cardias y unión gastroesofágica (16)].

El carcinoma gástrico se clasifica, de acuerdo al grado de invasión de pared gástrica, en temprano o avanzado. El concepto de carcinoma gástrico temprano (CGT) fue definido por la Sociedad Japonesa para el estudio del Cáncer Gástrico en 1963, considerando en estos pacientes la posibilidad de resección quirúrgica completa con fines curativos (17).

Se han referido altos niveles de supervivencia postoperatoria si el diagnóstico se hace en la fase temprana: 81-91% a los 5 años, frente al 4-36% si se trata del carcinoma avanzado (18).

Las estrategias existentes actualmente como tamizaje para cáncer gástrico tienen como objetivo disminuir la mortalidad al curar con la cirugía a la mayoría de los pacientes que se detectan en fase temprana, de ahí la importancia de disponer de un marcador pronóstico de esta patología. El pepsinógeno ha demostrado ser un instrumento de gran **utilidad como "screening" en la detección precoz del cáncer gástrico**: la evaluación del pepsinógeno **como factor de riesgo de cáncer** gástrico por ciertos autores conduce en todos ellos a asociar el descenso del PG I y el ascenso del PG II como factor de riesgo. Si bien ciertos autores (19) establecen un valor de cut-off inferior a 40 ng/ml para pepsinógeno I y la relación PG I/PG II <3, otros (20) rebajan este cut-off para PG I hasta 18,7 y coinciden en el valor del cociente con una sensibilidad del 0,50 y una especificidad de 0,87.

En los carcinomas gástricos, la expresión tumoral del pepsinógeno (PG I en suero y orina) varía significativamente en función del sexo de los pacientes, así como con el grado histológico de los tumores y el estado de afectación de los ganglios linfáticos regionales. El porcentaje de tumores positivos para el pepsinógeno es significativamente más elevado en los varones con relación a las mujeres y también en los tumores bien diferenciados con relación a los moderados o pobremente diferenciados. Además, los carcinomas gástricos sin afectación tumoral de los ganglios linfáticos regionales muestran también un porcentaje significativamente más elevado de casos positivos para el pepsinógeno en comparación a los tumores con metástasis ganglionares.

Por otra parte, el PG I urinario podría ser utilizado como marcador tumoral útil en la detección de recurrencias de cáncer gástrico después de una gastrectomía total (21).

Tabla II: Niveles de pepsinógeno en patologías digestivas.

	PG I (ng/ml)	PG II (ng/ml)	PG I/PG II (ng/ml)
CONTROLES NORMALES	42,9 ± 2*	7,5 ± 0,8*	6,3 ± 0,3*
HELICOBÁCTER PYLORI	51,6 ± 3*	16,0 ± 1*	↓ 3,5 ± 0,2*
* Valores numéricos correspondientes al valor medio ± dos desviaciones estándar. * Datos bibliográficos: Asakka et al Gastroenterology 1992; 102: 760-766			
CONTROLES NORMALES	66,3 ± 3,2 •	11,1 ± 0,5 •	6,2 ± 0,2 •
GASTRITIS:			
SUPERFICIAL	↑ 86,5 ± 4,6 •	↑↑ 21,2 ± 1,2 •	↓ 4,3 ± 0,2 •
MEDIA/MODERADA	↑ 55,0 ± 8,6 •	↑↑ 18,2 ± 1,6 •	↓ 2,9 ± 0,4 •
ATRÓFICA SEVERA	↓ 9,6 ± 2,2 •	↑ 12,5 ± 1,1 •	↓↓ 0,7 ± 0,2 •
ÚLCERA PÉPTICA	↑ sin utilidad diagnóstica		
METAPLASIA GÁSTRICA	↓	↓	
CARCINOMA GÁSTRICO	↓ <40	↑	<3,5

- Valores numéricos correspondientes al valor medio ± dos desviaciones estándar.
- Datos bibliográficos: Samloff et al Gastroenterology 1982; 83:204-209.

BIBLIOGRAFÍA

1. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis. An imbalance of positive and negative regulation. Cell 1991; 64: 327-336.
2. Gottesman M. The role of proteases in cancer. Semin Cancer Biol 1990; 1: 97-160.
3. Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Dano K, Blichert-Toft M. High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. Cancer Res 1993; 53: 2513-2521.
4. Miki K, Ichinose M. Chronic atrophic gastritis and serum pepsinogen levels. Jpn J Cancer Clin 1992; 38: 221-9.
5. Kikuchi S, Wada O, Miki K, et al. Serum pepsinogen as a new marker for gastric carcinoma among young adults. Cancer 1994; 73: 111-15
6. Gritti I, Banfi G, Roi G. S Pepsinogens: Physiology, Pharmacology, pathophysiology and exercise. Pharmacological Research Vol. 41. No 3, 2000 March 1; 1096-1186.
7. Azuma T, Ito Y, Suto H, Ohtani M, Dojo M, Muramatsu A, Kuriyama M, Kato T. The effect of Helicobacter pylori eradication therapy on dyspepsia symptoms in industrial workers in Japan. Aliment Pharmacol Ther 2001 Jun; 15(6): 805-11.

8. Eleftherios P Diamandis, Sheyla Nadkarni, Banani Bhaumik Aly Abdelrahman, Dimitrios N Melegos, Gudrun Borchert, Margot H Black, Marta Alonso, Ana Salas, Juan R de los Toros, Andrés Sanpedro, Carlos López-Ortín. Immunofluorometric assay of pepsinogen C and preliminary clinical applications *Clinical Chemistry* 1997; 43:8 1365-1371.
9. Fred M Hunter, Pelayo Correa, Elizabeth Fonthan, Bernardo Ruiz, Mahboob Sobhan, Micheael Samloff. Serum Pepsinogens as Markers of Response to Therapy for *Helicobacter pylori* Gastritis. *Digestive Diseases and Sciences* 1993. Vol. 38, No 11, 2081-2086.
10. Kalantar J *et al*: Chronic gastritis and nonulcer dyspepsia. *Curr top Microbiol Immunol* 1999; 241:31.
11. Peek RM Jr, Blaser MJ. Pathophysiology of *Helicobacter pylori*-induced gastritis and peptic ulcer disease. *Am J Med* 1997; 102:200.
12. Kuipers EJ, Pérez-Pérez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1777-80.
13. J Parsonnet, GD Friedman, Norentreich, H Vogelmann. Risk for gastric cancer in people with *CagA* positive or *CagA* negative *Helicobacter Pylori* infection. *Gut* 1997; 40:297-301.
14. Greenlee RT *et al*. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50:7.
15. Walsh D *et al*. The symptoms of advanced cancer: Relationship to age, gender, and performance status in 1000 patients. *Support Care Cancer* 2000; 8:175.
16. Devesa SS *et al*. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinomas in the United States. *Cancer* 1998; 83:2049.
17. Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1995; 333:32.
18. A Kokkola, R Haapiainen, F Laxen P Puolakkainen, E Kivilaakso, J Virtamo, P Sipponen. Risk of gastric carcinoma in patients with mucosal dysplasia associated with atrophic gastritis: a follow up study. *J Clin Pathol* 1996.
19. Aoki K, Misumi J, Kimura T, Zhao W, Xie T. Evaluation of cutoff levels for screening of gastric cancer using serum pepsinogens and distributions levels of serum pepsinogen I, II and of PGI/PGII ratios in a gastric cancer case control study. *J Epidemiol* 1997 Sep; 7(3): 143-51.
20. Fujimoto H, Sasaki Y, Kawamura T, Ishimoi A, Yanagiya Y, Saita T. An evaluation of tumor markers and risk factors in mass screening for various cancers. *Rinsho Byori* 1993 Jun; 41(6): 642-8.
21. Toshiharu Yamaguchi, Toshio Takahashi, Yakashi Yokota, Kazuya Kitamura, Akinori Noguchi, Michiko Kamiguchi, Masaki Doi, Tatsuyuki Ahn, Kiyoshi Sawai and Tetsuro Yamane. Urinary Pepsinogen I as a Tumor marker of Stomach Cancer After Total Gastrectomy. *Cancer* 1991; 68:906-909.

8. Avances en control de la inmunosupresión. Monitorización terapéutica del Ácido Micofenólico

José A. Noguera Velasco, María Isabel Macizo Soria, Francisco Javier Salinas Hernández y Félix Martínez Monge

Servicio de Análisis Clínicos. H.U. «Virgen de la Arrixaca»

A mitad de la década de los ochenta la supervivencia de los trasplantes de riñón aumentó significativamente con la introducción de la Ciclosporina A (CsA). La vida media de supervivencia del injerto a un año creció en un 12%.

Posteriormente, se produjeron sucesivos incrementos con la introducción de nuevos inmunosupresores: *anticuerpos anti-linfocíticos policlonales*, *anticuerpos monoclonales (OKT3)* y *anticuerpos contra los componentes del CMH clase II*.

Los inmunosupresores se dan para interrumpir o bloquear los mecanismos inmunológicos que aparecen durante el rechazo del injerto, interfiriendo la función y metabolismo de las células activadas.

Los lugares para esta intervención son la inhibición de:

- Activación de células T por bloqueo de anticuerpos.
- Producción de citocinas por inhibición de la síntesis o neutralización de anticuerpos.
- Antimetabolitos del ciclo celular.

Uno de estos antimetabolitos es el micofenolato de mofetilo (MMF), después de la ingestión, la forma éster es hidrolizada rápidamente a ácido micofenólico (MPA) que actúa como inhibidor selectivo, reversible y no competitivo de la inosin monofosfato dehidrogenasa (IMPDH); un enzima clave en la síntesis de novo de los nucleótidos de guanina. Ya que la activación de los linfocitos se realiza a través de la ruta de novo para la síntesis de purinas, el MPA bloquea la proliferación de células T y B que seguiría a su activación. En trasplantes experimentales el MMF ha demostrado ser efectivo en la prevención del rechazo y en la prolongación de la supervivencia del injerto.

Inicialmente, el MMF fue desarrollado como un inmunosupresor primario tras el trasplante asumiendo que, similarmente a CsA y tacrolimus, habrían de monitorizarse los niveles valle. Más tarde, la decisión de emplear el MMF como un inmunosupresor secundario y el éxito de los subsiguientes ensayos clínicos después de trasplante renal y cardíaco hizo que se recomendaran dosis fijas de MMF tras el trasplante.

Esto hace que la monitorización terapéutica (TDM) de los niveles MPA no esté generalmente aceptada en el tratamiento de pacientes adultos, sin embargo hay una evidencia creciente de que esta monitorización puede ayudar a disminuir los efectos secundarios del MMF tanto a corto como a largo plazo (1, 2) y a la prevención de la

sobre inmunosupresión a largo plazo. No obstante, no está totalmente establecido que las concentraciones valle reflejen la acción inmunosupresora sobre el enzima clave IMPDH (3). La medición de la actividad IMPDH no está disponible generalmente, pero se propone que un 50% de inhibición de este enzima debería ser suficiente para conseguir una inmunosupresión efectiva, encontrando estos niveles de inmunosupresión para valores medios de AUC de 59 $\mu\text{g} \times \text{h/ml}$ y entre 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de MPA (3) para concentraciones valle.

El gold estándar para la medida de la exposición y bio-disponibilidad del MMF debería ser un perfil farmacocinético del área bajo la curva (AUC) del ácido micofenólico (4), sin embargo este perfil completo es complicado y caro. Por tanto, existe un gran interés acerca de estrategias de muestreo que proporcionen datos que predigan el AUC con el mayor grado de exactitud posible, pero empleando la menor cantidad de puntos. En este sentido existen diferentes estudios que proveen aproximaciones de tres puntos con diferentes grados de correlación ($r^2 \approx 0,87 - 0,88$) (5, 6).

Tabla 1: Diferentes modelos matemáticos de curvas abreviadas hallados por Análisis de Regresión Múltiple, y su correlación con el área bajo la curva total (AUC).

Tiempos de muestreo	Modelo de ecuación	Coef. Correl. Pearson r^2	Ref. Bibliograf.
1, 2 y 6 horas	$10,75 + 0,98^* C1 + 2,38^* C2 + 4,86^* C6$	0,87	6
0. 0.5 y 2 horas	$15,79 + 2,05^* C0 + 0,95^* C0.5 + 3,73^* C2$	0,74	6
0, 75 min y 6 horas	$5,2 + 7,1^* C0 + 1,0^* C75 \text{ min} + 5,4^* C6$	0,88	5
0, 40 min y 2 horas	$9,13 + 5,7^* C0 + 1,1^* C40 \text{ min} + 2,1^* C2$	0,74	5

Un punto que se debe tener en cuenta es que los modelos que producen una mayor correlación con el área bajo la curva son aquellos que incluyen un punto a las 6 horas, lo que para algunos centros y pacientes ambulatorios podría presentar graves inconvenientes. Mientras que las estrategias de muestreo que sólo llegan a las 2 horas poseen un menor grado de predicción del AUC, y por tanto del estado de inmunosupresión del paciente. Otra consideración es que un modelo determinado puede no tener el mismo grado de validez según la población específica a que se aplique, por ejemplo, adultos vs niños, poblaciones con diferente tiempo post trasplante o grupos con diferente tipo de trasplante.

Con fines prácticos, algunos autores recomiendan el uso de concentraciones valle para monitorización rutinaria del tratamiento con MMF, y la realización de una curva de al menos tres puntos que incluya un punto a las seis horas en el caso de que se sospeche toxicidad o baja inmunosupresión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Filler G, Eric JHH. Mycophenolic mofetil for rescue therapy in acute renal transplant rejection in children should always be monitored by measurement of trough concentration. *Nephrol Dial Transplant* 1977; 12:374-5.
2. Shaw LM, Kaplan B, Kaufman D. Toxic effects of immunosuppressive drugs: Mechanims and strategies for controlling them. *Clin Chem* 1996; 42:1316-21.

3. Langman LJ, LeGatt D F, Halloran PF, Yatscoff RW. Pharmacodynamic assesment of mycophenolic acid-induced immunosupression in renal transplant recipients. *Transplantation* 1996; 62(5):666-672.
4. Hale MD, Nicholls AJ, Bullingham RE, *et al.* The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 64(6):672-83.
5. Schütz E, Armstrong VW, Shipkova M, *et al.* Limited sampling strategy for determination of mycophenolic acid area under the curve in pediatric Kidney recipients. German Study Group on MMF Therapy in Pediatric Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc* 1998; 30(4):1182-4.
6. Filler G, Mai I. Limited Sampling Strategy for Mycophenolic acid Area Under the Curve. *The Drug Monit* 2000, 22:169-173.