FUNDACIÓN
Alberto J.
ROEMMERS

Anales de la **Fundación Alberto J. Roemmers**



Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers

Volumen XXXIV

Índice

Subsidios 2019 - 2021

IMPACTO DEL LEUCOTRIENO C4 EN EL DESARROLLO DE PATOLOGÍAS INFLAMATORIAS

J. Alcain, G. Mora, A. Andrush, P. Catuogno, A. Vera, S. Vanzulli, M. Vermeulen. p. 11

SELECCIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS PARA ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA EN POBLACIÓN ARGENTINA. CONSTRUCCIÓN DE PERFILES DE RIESGO CON UTILIDAD DIAGNÓSTICA

F. Aranda, S. Perés Wingeyer, C. Duboscq, J. Ceresetto, P. Casais, G. de Larrañaga. p. 46

ROL DEL EJE IL33/ST2 EN EL RECHAZO CRÓNICO DE TRASPLANTE HEPÁTICO HUMANO

P. C. Arriola Benítez, M. Santillán, L. Pérez Illidge, J. Moreira, A. Castro, V. Atencio, M. F. Fernandez, C. Tiribelli, V. Descalzi, M. Rumbo, M. V. Gentilini, G. Gondolesi. p. 63

BRONQUIOLITIS POR VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO: BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES QUE PREDIGAN LA SEVERIDAD DE LA INFECCIÓN EN NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS

L. Arruvito. p. 73

ABORDAJE EPIDEMIOLÓGICO-SOCIOCULTURAL EN LA PERIFERIA DE POSADAS-MISIONES: SUFRIMIENTO SOCIOAMBIENTAL EN EL ASENTAMIENTO LOS OBREROS

M. A. Avalos. p. 80

COMPARACIÓN DE DOS PUNTAJES DE RIESGO DE COLESTEROL LDL ELEVADO CON HERENCIA POLIGÉNICA EN CASOS DE NUESTRA POBLACIÓN CON FENOTIPO DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR CON Y SIN VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS

V. Bañares, G. López, J. Martini. p. 98

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA STEM CELL LEUCÉMICA (CD26+) EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA. DETERMINAR SU IMPACTO PRONÓSTICO EN LA REMISIÓN MOLECULAR PROFUNDA Y LA DISCONTINUACIÓN DEL TRATAMIENTO

R. M. Bengió, M. Peña, M. F. Palacios, I. B. Larripa. p. 105

COMUNICACIÓN ENTRE ÓRGANOS EN SITUACIONES DE INSULINO-RESISTENCIA Y SU SINERGISMO EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

G. Berg, M. Barchuk. p. 113

MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y FACTORES DE RIESGOS ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR TOXOCARA EN UNA POBLACIÓN DE NIÑOS DEL NORDESTE ARGENTINO

M. V. Bojanich, A. Sosa, S. Meyer, M. Á. López, M. Medina. p. 122

BÚSQUEDA DE UN BIOMARCADOR MOLECULAR TEMPRANO, PREDICTOR DE ESTADIO, DURANTE LA PROGRESIÓN DEL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

F. A. Bruna. p. 126

ESTUDIO PILOTO DE CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN MUJERES GESTANTES ENTRAS LAS 24 Y 28 SEMANAS CON EL PESO AL NACER DE SUS BEBÉS

A. L. Burgueño, M. I. Curriá, M. J. Cerar, G. Rovira, M. Saban, G. Ernst. p. 137

DETECCIÓN DE TOXINAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS DE PORTADORES NASALES Y GENOTIPIFICACIÓN

F. Buzzola. p. 145

RELEVANCIA CLÍNICA DE LA EXPRESIÓN DE PDCD4 EN CÁNCER DE MAMA

R. I. Cordo Russo, S. Madera, M. G. Pereira, M. F. Chervo, V. A. Chiauzzi, R. Schillaci, E. Gil Deza, P. V. Elizalde. p. 151

CONTROL INMUNOHEMATOLÓGICO DE EMBARAZADAS DE LA PROVINCIA DE SAN JUAN

S. A. Farina Álves, A. Archilla, E. González, A. J. Laplagne. p. 166

TASA DE COBERTURA DE VACUNACIÓN CONTRA LA HEPATITIS B EN ARGENTINA

D. Flichman. p. 188

INFECCIÓN POR POLIOMAVIRUS JC Y BK EN TRASPLANTADOS DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA, ARGENTINA

M. C. Frutos, N. Maldonado, N. Y. Barahona, M. Balangero, S. Blanco, G. Castro, P. Sicilia, G. Barbas, S. Gallego. p. 191

EVALUACIÓN DE MECANISMOS INMUNOLÓGICOS ASOCIADOS AL RECHAZO DEL TRASPLANTE INTESTINAL. ROL DE LOS LINFOCITOS T REGULATORIOS E INFLUENCIA DEL RÉGIMEN DE INMUNOSUPRESIÓN

M. V. Gentilini, C. Arriola Benítez, A. Machicote, L. Pérez Illidge, A. Castro, M. F. Fernández, C. Fuxman, D. Ramisch, C. Rumbo, M. Rumbo, L. Fainboim, G. Gondolesi. p. 206

SIGNIFICANCIA PRONÓSTICA DE RANK EN FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL TUMOR EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA TEMPRANO

M. B. Giorello, F. R. Borzone, M. F. Mora, M. del R. Padín, A. Wernicke, V. Labovsky, N. A. Chasseing. p. 214

DESARROLLO DE MÉTODO DE DETECCIÓN DE MYCOPLASMA GENITALIUM Y ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS DE LA INFECCIÓN EN PACIENTES FEMENINOS

P. Kunda, J. Mosmann, A. Salas, N. Lujea, X. Kiguen, E. López Asencio, C. Oyarzabal, L. Ganzer, J. Sad Larcher, C. Cuffini. p. 241

RELEVANCIA PRONÓSTICA DEL MICROBIOMA EN EL TEJIDO TUMORAL DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

V. Labovsky, L. Dandeu, A. Penas-Steinhardt, P. Aguilera, P. Marenco, M. P. Carballo, M. F. Alsina, M. P. Vázquez, A. Wernicke, N. A. Chasseing. p. 250

DINÁMICA DE LOS RESERVORIOS DE VIH LUEGO DEL TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C EN INDIVIDUOS COINFECTADOS POR VIH Y HEPATITIS C: ROL DE LOS GENES INDUCIDOS POR INTERFERÓN

N. L. Laufer. p. 333

ABORDAJE MOLECULAR DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES: DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y ASESORAMIENTO GENÉTICO

L. N. Luce, C. Mazzanti, M. Carcione, F. Giliberto. p. 339

ROL DEL RECEPTOR A HISTAMINA H4 COMO BIOMARCADOR ASOCIADO AL PRONÓSTICO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA
V. A. Medina, D. Speisky, M. A. Táquez Delgado, A. Iotti, M. B. Nicoud, I. A. Ospital, F. Vigovich, P. Dezanzo, G. Ernst, J. L. Uriburu. p. 351

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS Y PATOLOGÍAS NEUROPSIQUIÁTRICAS EN SALIVA HUMANA
M. C. Monteleone. p. 361

PREVALENCIA DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA RESPIRATORIA: CHLAMYDIA SPP, EN NIÑOS INTERNADOS EN EL HOSPITAL INFANTIL MUNICIPAL DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA
J. P. Mosmann, C. G. Cuffini, A. X. Kiguen, R. F. Venezuela. p. 368

PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN Y REPARACIÓN DEL DAÑO AL ADN COMO INDICADORES DE RESPUESTA CLÍNICA Y EVOLUCIÓN EN PACIENTES ONCOLÓGICOS TRATADOS CON CISPLATINO
S. B. Nadin, L. M. Vargas Roig, M. L. Sottile Fleury, F. D. Cuello Carrión, J. Ibarra, S. Semino, L. González. p. 379

RELACIÓN FENOTIPO - GENOTIPO Y ESPECTRO DE VARIANTES GENÉTICAS EN PACIENTES CON HIPERTRIGLICERIDEMIA SEVERA EN LA POBLACIÓN ARGENTINA
J. P. Nogueira. p. 394

VIGILANCIA MOLECULAR DE ESCHERICHIA COLI PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STEC) EN MATERIA FECAL, EN LOS CONTACTOS CERCANOS DE PACIENTES CON SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)
M. S. Palermo, G. A. Fiorentino. p. 402

ESTUDIO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE RETINOBLASTOMA Y ASESORAMIENTO GENÉTICO
D. L. Parma. p. 419

POLIMORFISMOS EN DECTIN-1 Y LA INFECCIÓN TUBERCULOSA
M. Pastorini. p. 426

LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO: MARCADORES PRONÓSTICOS S.
D. A. Perés, S. Porta, F. Aranda, E. M. Kerzberg. p. 439

MORFOFUNCIONALIDAD TÍMICA Y RESULTADOS DEL TRASPLANTE HEPÁTICO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS SOMETIDOS A DIFERENTES ESQUEMAS DE INMUNOSUPRESIÓN
A. R. Pérez. p. 450

BASES MOLECULARES DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS: ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE MODIFICADORES PRIMARIOS, SECUNDARIOS Y TERCIARIOS
K. G. Scheps, H. M. Targovnik. p. 458

ANÁLISIS ESPACIOTEMPORAL DE AGRUPAMIENTOS DE SUICIDIOS EN LA LOCALIDAD DE ARRECIFES (PROVINCIA DE BUENOS AIRES - ARGENTINA), DURANTE EL PERIODO DE MARZO 2018 A FEBRERO 2019
D. Serrani, C. Turri, K. Castro. p. 478

VALOR PRONÓSTICO DE LOS DESBALANCES GENÓMICOS EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE. SU IMPORTANCIA EN LA ESTRATIFICACIÓN DE RIESGO
I. Slavutsky, F. Stella, C. Galvano, A. Krzywinski, A. Rodríguez, S. Zabaljáuregui. p. 490

PRESENCIA DE VIRUS ONCOGÉNICOS Y POTENCIALMENTE ONCOGÉNICOS EN CAVIDAD ORAL DE PERSONAS VIVIENDO CON VIH
A. A. Sotelo, G. Deluca. p. 501

ANÁLISIS DE MUTACIONES DEL GEN TP53 EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA. SU IMPORTANCIA CLÍNICA
C. Stanganelli, J. Cabrera, M. Sarmiento. p. 524

ROL DE LAS VARIANTES BACTERIANAS PERSISTENTES EN LA REFRACTARIEDAD AL TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO DURANTE LA OSTEOMIELITIS CRÓNICA CAUSADA POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS
C. M. Suligoy Lozano. p. 537

BIOLOGÍA EN CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LAS PRIMERAS DOS GENERACIONES DE NYSSOMYIA NEIVAI (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EN UNA COLONIA EXPERIMENTAL EN ARGENTINA
E. Szelag, S. Gómez Gallipoliti, M. Ellena, J. Rosa. p. 545



ALBERTO J. ROEMMERS

1890 – 1974

FUNDACIÓN
Alberto J.
ROEMMERS

Creada por
Doña Candelaria N. Wolter de Roemmers e hijos
en el año 1975

Presidente
Dr. Rodolfo F. Hess

Vicepresidente
Dr. Ángel Omar Scapin

Secretario
Dr. Julio A. Bellomo

Vocales
Lic. Eduardo Macchiavello
Dr. Guillermo Fornari
Dra. Rosario Mazzei
Dra. María Florencia Muracciole
Dr. Joaquín Sorroche

Fiscalizadores
Dra. Adriana Mira
Dr. Mauricio A. Stortoni

INTRODUCCIÓN

En este volumen se publican los subsidios del Período 2019 – 2021, se han volcado todos los informes finales de los grupos de investigación que desarrollaron sus tareas en ese lapso.

Con esta publicación la Fundación Alberto J. Roemmers, mantiene su compromiso adquirido hace más de cuarenta y cinco años de apoyar a la investigación médica en nuestro país, a través de subsidiar planes rigurosamente seleccionados todos los años.

Se han visto beneficiados más de 1.000 grupos de investigación a lo largo de todo el país, en temas de investigación Básica, Aplicada y de Epidemiología y Salud Pública.

IMPACTO DEL LEUCOTRIENO C4 EN EL DESARROLLO DE PATOLOGÍAS INFLAMATORIAS

Julieta Alcain, Gabriela Mora, Adriana Andrush, Patricia Catuogno, Adriana Vera, Silvia Vanzulli, Mónica Vermeulen

Academia Nacional de Medicina. IMEX - CONICET

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) ha incrementado en el mundo durante los últimos años. Este desorden inflamatorio crónico que afecta el intestino está representado por dos entidades bien definidas: por un lado, la enfermedad de Crohn (EC), que es una inflamación transmural que afecta principalmente todo el intestino delgado. Aunque puede afectar cualquier segmento del tracto digestivo desde la boca al ano; y por el otro, la colitis ulcerativa (CU), que afecta el colon superficialmente (1). La prevalencia de esta patología es de 400 casos cada 100.000 personas, siendo más representativa entre ellas la CU. Los pacientes con EII sufren alternancia de síntomas clínicos que van de leves a severos con etapas de remisión. El desarrollo de estas enfermedades se caracteriza por una compleja interacción entre diversos factores que incluyen la susceptibilidad genética, el ambiente, la microbiota y el sistema inmune (2,3). La alta prevalencia de este tipo de enfermedades en el mundo sugiere un fuerte componente genético (4). El factor heredable en las familias es más importante para la EC que para la CU, con una tasa de concordancia para los gemelos homocigotas de 30 a 58% para la EC, contra un 10-15% para la CU. Los estudios de genoma completo (GWAS) revelaron que los pacientes con EII presentan polimorfismos de nucleótido único (SNPs) que afectan la expresión de diversos genes asociados al funcionamiento de las células de Paneth, el epitelio y la respuesta inmune (4,5). Esto conlleva a un alto riesgo de desarrollar una respuesta inflamatoria, así como a una baja respuesta a los fármacos (5). Por ejemplo, de las variantes genéticas asociadas al desarrollo de la EC, polimorfismos en Nod2 confieren mayor riesgo. Nod2 es el dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2. Tiene una importante función en el sistema inmune como receptor de reconocimiento de patrones y es activado por la unión de peptidoglicanos modificados presentes en las micobacterias. Se sabe que la señalización vía Nod2 regula la inmunidad intestinal y la tolerancia, a través de la producción de citoquinas proinflamatorias, la inducción de proteínas antimicrobianas, la generación de radicales libres del oxígeno y el incremento de la muerte bacteriana (6,7). Cabe señalar, sin embargo, que si bien la pérdida de función de Nod2 incrementa el riesgo de desarrollar EC, esto no sucede en muchos de los individuos que poseen este polimorfismo, por lo cual otros factores de riesgo evidentemente contribuyen para el desarrollo de esta patología.

Los estudios epidemiológicos muestran cada vez en mayor medida que el impacto de los factores ambientales es determinante como disparador de la respuesta inflamatoria

asociada a la EII. El hábito de fumar, el uso de antibióticos durante las primeras etapas de vida, los esteroides, los anticonceptivos y las estatinas utilizadas normalmente para disminuir los niveles de colesterol, incrementan el riesgo en más de un 2% de desarrollar EII (8-14). Esto se debe a que estos factores alteran la homeostasis y la microbiota normal, favoreciendo la colonización por bacterias que alteran la integridad de la barrera epitelial. En última instancia, esto permite el ingreso de microorganismos que activan de manera exacerbada la respuesta inmune de la mucosa intestinal, colaborando a la inflamación (15,16).

Desde hace unos años se reconoce la importancia del microbioma, es decir, el conjunto de genes de los microorganismos presentes en el organismo en el desarrollo y control del sistema inmune (3,17). Aproximadamente 40 millones de especies habitan nuestro organismo, alcanzando en el intestino la mayor concentración. Si bien cada individuo posee un microbioma característico, las especies más abundantes pertenecen a los géneros Firmicutes y Bacteroides. Los pacientes con EII presentan disbiosis de la microbiota, lo que implica una disminución en la diversidad de la flora acompañante (18,19), y en particular, una mayor proporción de bacterias inflamatorias en comparación con las anti-inflamatorias. Se promueve la colonización del nicho intestinal por parte de Protobacterias y Bacteroides, mientras que se ve desfavorecido el género de las Firmicutes. Todos estos cambios en la microbiota comensal conllevan a una menor producción de ácidos grasos de cadena corta, disminuyendo la expansión y diferenciación de las células T regulatorias y epiteliales (20). Asimismo, el incremento de las Protobacterias como E. coli, que tienen gran capacidad de adherencia al epitelio, altera la permeabilidad de la mucosa.

El tracto gastrointestinal por lo general se encuentra bajo una regulación fina que mantiene la homeostasis impidiendo el paso de la microbiota y de agentes patógenos a través de la barrera epitelial (21), pero alteraciones que afectan la integridad del epitelio representan un aporte importante en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias (21,22). Los pacientes con EC presentan una permeabilidad anormal en la mucosa intestinal en distintos grados dependiendo de la gravedad del cuadro. Asimismo, el análisis inmunohistoquímico de las biopsias permitió establecer que se hallan disminuidas muchas de las proteínas presentes en las uniones estrechas, como la ocludina y la cadherina (23,24), encargadas de mantener la integridad de la barrera. Se demostró también que deficiencias en la mucina 2, principal proteína secretada por las células caliciformes, tienen una fuerte asociación con el desarrollo de estas entidades (25,26). En definitiva, todas estas alteraciones conducen a la activación de la respuesta inmune. Si bien la EC y la CU se asocian a la exacerbación de la respuesta inflamatoria, los mecanismos exactos que determinan su origen son poco conocidos aún (4,5).

Las células dendríticas (CD) de mucosa ejercen un rol principal tanto en la determinación de la tolerancia como en la inducción de la respuesta respuesta inmune. Se componen de dos subtipos distintos, las CD convencionales y las plasmacitoides, ambos presentes en el GALT. Una fracción de las CD convencionales se caracteriza por la expresión de la integrina αE (CD103), y se caracterizan por su rol central en mantener la homeostasia del intestino (5). Se las denomina comúnmente como CD tolerogénicas y su función principal es inducir la diferenciación de las células T regulatorias las que controlan la activación y/o proliferación de los linfocitos T vírgenes en células efectoras. Diversos trabajos demostraron que la deficiencia de las CD tolerogénicas está asociada al desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales (23).

La ruptura del balance entre las señales inflamatorias y anti-inflamatorias con la consecuente migración de leucocitos a la mucosa intestinal resulta en la perpetuación y exacerbación de la respuesta efectora T en la EII. Cabe señalar que los mecanismos efectores T en ambas entidades son diferentes: mientras que en la EC la respuesta es netamente Th1 y Th17, en la CU la respuesta es de tipo Th2. En el primer caso, la diferenciación es dependiente de la producción de IL-12, IL-23 y IL-28 y el TGF-β por las células dendríticas y los macrófagos. Posteriormente, las células Th1 y Th17 secretan IFN-γ, TNF-α e IL-17, que activan diferentes leucocitos induciendo la producción de más citoquinas inflamatorias que perpetúan el estado inflamógeno (3-5).

Los tratamientos actuales hacen blanco en la respuesta inmune patológica, basándose en el uso secuencial de agentes inmunomoduladores como el metotrexato y la aziatropina (27,28), biológicos como los anticuerpos para bloquear citoquinas inflamatorias (anti-TNFα y anti-IL-12), e inmunosupresores (29,30). Para el tratamiento de la CU y mantener la remisión de EC, el inmunosupresor sulfazalazina y su metabolito activo, el ácido 5-aminosalicílico, conocido como mesalazina o mesalamina, son los fármacos de elección (31,32), ya que bloquean la acción de la lipooxigenasa (LOX) y por lo tanto inhiben la producción de leucotrienos de diversos tipos, los cuales pueden actuar como mediadores inflamatorios activadores de la respuesta inmune. Sin embargo, todos estos tratamientos tienen importantes limitaciones ya que son efectivos en grupos particulares de pacientes y a largo plazo pierden efectividad aumentando la incidencia de infecciones y desarrollo de procesos neoplásicos (33). Por todo esto, es de interés desarrollar terapias más racionales que tengan como blanco tanto el microbioma como el sistema inmune sin afectar el epitelio.

Los cisteinil leucotrienos (CysLT) son potentes mediadores lipídicos secretados por los leucocitos activados (34,35). Su síntesis se limita a las células de origen mieloide como los mastocitos, eosinófilos, basófilos y macrófagos (36). Estos mediadores se producen después de que el ácido araquidónico se libera de los fosfolípidos de la membrana a través de la vía de la lipoxigenasa (LOX), produciendo el leucotrieno A4 (LTA4). Este intermediario es responsable tanto de la síntesis del leucotrieno B4 (LTB4) como del LTC4, pasos que requieren de la hidrolasa de LTA4 y la actividad de la sintasa de LTC4, respectivamente. El LTC4, mediante la posterior adición de residuos de cisteína, se convierte en los otros productos metabólicos de la cascada de los CysLTs, el LTD4 y el LTE4 (37,38). Los CysLT son potentes espasmógenos, broncoconstrictores y promotores de la secreción de moco (36), y generalmente se asocian a enfermedades inflamatorias que afectan a la mucosa. Su producción excesiva está relacionada con los síntomas patológicos correspondientes a varios trastornos inflamatorios, como las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, la artritis, la psoriasis y las enfermedades intestinales, incluidas la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn (39,40). Sus efectos farmacológicos y fisiológicos se llevan a cabo a través de dos tipos principales de receptores de membrana: el receptor de tipo 1 (CysLTR1) y de tipo 2 (CysLTR2), que son receptores acoplados a la proteínas G (36), y que fueron descriptos inicialmente a nivel del íleon y el colon (41) asociados a las membranas de la mucosa. De hecho, en muchas enfermedades inflamatorias que afectan a la mucosa, como el asma y la cistitis intersticial, el uso de montelukast (MK), el antagonista del receptor CysLTR1, antagoniza los efectos de los CysLT, a través de la inhibición del Ca^{++} citosólico (41,42).

Se ha demostrado una mayor producción de mediadores lipídicos durante las etapas activas de la enfermedad intestinal (46). Sin embargo, a través de los distintos estudios se generan discrepancias en relación a la importancia de esta vía en la alteración de la

respuesta inmune y en la disrupción de la barrera epitelial observada en este tipo de cuadros. Recientemente, de Oliveira y col. (4), utilizando ratones Knockout para la lipooxigenasa, es decir con producción deficiente de los leucotrienos (LTB4 y CysLTs), demostraron que la inducción de tolerancia oral no afecta la capacidad de los ratones para producir las citoquinas inflamatorias IFN-γ e IL-5. Sin embargo, existe una creciente evidencia de que los CysLTs afectan la proliferación y apoptosis de las células epiteliales intestinales (48,49) y este mecanismo puede ser dependiente o independiente de la producción de prostagandinas. En este sentido, se demostró que la producción del LTD4 induce la secreción de prostaglandina E2 (PGE2) (50). Por el contrario, se demostró también en una línea celular epitelial que el LTD4 rompe la barrera epitelial independientemente de la síntesis de PGE2 (51).

El principal receptor involucrado en la respuesta inflamatoria a nivel de la mucosa es el CysLTR1 (48,52). En un modelo murino de úlceras gástricas inducidas por lesión por isquemia/reperfusión, se mostró una correlación entre el incremento en la expresión de CysLTR1 en el estómago, el aumento del nivel de CysLTs y el empeoramiento de la patogénesis. Es de destacar que en este modelo experimental, la enfermedad depende de LOX y no de COX; enzima responsable de la síntesis de prostaglandinas, y por lo tanto serían centrales los leucotrienos (53). Además, en un modelo murino de colitis ulcerosa, Barajas-Espinosa y col. (54) demostraron que el CysLTR2 se expresa principalmente en el colon y que la señalización de los CysLTs a través de este receptor está involucrada en la permeabilidad endotelial, la inducción de TNF-α y el edema colónico. Recientemente, demostramos que el LTC4 aumenta la patogenicidad de la cepa enterohemorrágica de Escherichia coli (ECEH) en ratones, lo que induce la alteración de la integridad intestinal, un mecanismo que puede facilitar que la toxina Shiga (Stx) alcance el torrente sanguíneo (55).

Se ha reportado un aumento en el número de mastocitos en las biopsias de pacientes con EII en comparación con los controles sanos (56) o un mayor grado de degranulación de estas células (57). De hecho, el epitelio de los pacientes con EII muestra altos niveles de los mediadores principales secretados por los mastocitos; histamina, prostaglandinas y leucotrienos (58). El grupo de Casellas y col. (59) demostró en pacientes con EC inactiva un incremento del LTC4 en el lumen de los segmentos proximales al desarrollo de la enfermedad, lo que indicaría cambios de la barrera intestinal. Asimismo, en un modelo murino de colitis ulcerativa se demostró el papel pro-apoptótico del LTC4 (60) y la importancia del transportador MPR1 que al ser el principal exportador de este mediador producido en la célula, evita el daño epitelial y el aumento de la respuesta inflamatoria.

OBJETIVO

Teniendo en cuenta los antecedentes discordantes en relación al LTC4 y su acción sobre la mucosa intestinal, el objetivo central del presente proyecto fue determinar la capacidad de este mediador para alterar la normal homeostasis de la mucosa intestinal y cómo esto redunda en el desarrollo de patologías intestinales inflamatorias. El objetivo central fue abordado en profundidad a través de dos objetivos específicos:

- Estudiar en un modelo murino de tolerancia a la ovalbúmina, la capacidad del LTC4 de interferir con este proceso, a través de su interacción con el epitelio y/o por la inducción de una respuesta inmune netamente inflamatoria.

– Evaluar la correlación entre los niveles de LTC4 y sus receptores y loas manifestaciones inflamatorias en pacientes con EII comparados con individuos sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones.

Todos los experimentos se realizaron con ratones BALB/C hembras vírgenes de 2 meses de edad criados en la Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina. Se alojaron seis ratones por jaula y se mantuvieron a 20 ± 2°C bajo un esquema automático de luz/oscuridad de 12 h. El cuidado de los animales se basó en las normas de bioética institucionales.

Modelo de tolerancia.

Los ratones recibieron Ova en el agua potable (5 mg/ml) durante 4 días (61). Al inicio del esquema de administración de la Ova, los ratones no se trataron por vía oral (PBS) o se trataron con LTC4 (0,01 μM). Cuando se indica, los ratones se trataron con una dosis previamente evaluada de montelukast (MK, 0,1 μM) (62,55), que inhibe el efecto de LTC4 antagonizando el CysLT1, antes del tratamiento oral de LTC4.

Histología.

Los tejidos intestinales se enjuagaron en PBS (pH 7,4), se abrieron a lo largo del borde antimesentérico y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 3,5 horas a 4°C, y se enjuagaron en PBS. La criopreservación se realizó en sacarosa al 30% a 4°C por 24 horas. El tejido se congeló embebido en OCT y fue cortado en secciones de 10 μm en crióstato. Luego, las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) y se analizaron en campo claro usando un microscopio Leica DM IRB (Leica Microsystems).

Reacción de hipersensibilidad de tipo retardado.

En el día 15 posterior al tratamiento, los ratones recibieron 100 μg de Ova en 20 μl de PBS en la almohadilla plantar derecha, y PBS en la plantilla izquierda como control. Para determinar la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), la induración de la almohadilla se midió 48 h más tarde y se expresó como la diferencia media (± ES) entre ambas patas de cada grupo.

Medición de la producción de anticuerpos.

Obtuvimos sangre 15 días después de la inducción de la tolerancia a Ova, y la cantidad de anticuerpos específicos en el suero se determinó mediante el ensayo de ELISA. Brevemente, las placas de fondo plano de 96 pocillos se recubrieron con Ova (10 μg/ml en PBS) y se incubaron durante la noche a 4ºC. Después de lavar tres veces con solución salina tamponada con Tween-20 (TTBS) y bloquear con TTBS más seroalbúmina bovina (BSA), se añadieron por triplicado 100 μl por pocillo de las diluciones del suero (1/100) de los ratones inmunizados. Las placas se incubaron 90 min a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo con TTBS y se añadieron a cada pocillo 100 μl de anticuerpo monoclonal biotinilado hecho en rata anti-ratón cadena K (1/500 en PBS, Pharmingen). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron, se aplicó estreptavidina-peroxidasa y finalmente se desarrollaron las reacciones con el sustrato

cromogénico OPD (Sigma). Los controles negativos incluyeron pocillos con todos los reactivos excepto las diluciones de suero u Ova. Los resultados se expresan como valores medios de absorbancia a 492 nm.

Obtención de suspensiones celulares de los ganglios linfáticos mesentéricos.

A día 15, las suspensiones celulares de los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) se obtuvieron por disgregación a través de una malla en presencia de medio RPMI (Gibco-Life Technologies, Bs. As. Argentina). Después del lavado, las células se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), $5{,}5 \times 10^{-5}$ de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco-Life Tecnology, Bs. As. Argentina) a una concentración de 1×10^6 células/ml en presencia de Ova (2 µg/ml). Los sobrenadantes se recogieron después de 48 h de estimulación y se analizaron mediante ELISA para la determinación de citoquinas.

Obtención de células epiteliales.

Se extirparon los intestinos delgados y se abrieron a lo largo del borde anti-mesentérico. El tejido se colocó en una placa de Petri con una pequeña cantidad de PBS frío y se lavó exhaustivamente mediante inyección de PBS con una jeringa. El tejido se transfirió a una placa limpia y se añadió buffer HBSS (HBSS 500 ml, HEPES 25 mM, suero bovino fetal al 1% (HyClone Laboratories, Logan, UT), solución de 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina. El tejido se lavó suavemente para eliminar el contenido luminal. Para remover la monocapa epitelial, el tejido se suspendió en una solución de HBSS sin calcio ni magnesio + EDTA 5 mM y se agitó a 300 rpm durante 15 minutos a 37°C. El sobrenadante que contenía las células epiteliales fue centrifugado y las células epiteliales obtenidas (Ep) se resuspendieron en medio Hank suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina , 5% de SFB y 1% de aminoácidos no esenciales durante 4 días a 37°C hasta la obtención de una monocapa con aproximadamente el 80% de confluencia.

Citometría de flujo.

Se realizaron marcaciones celulares con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD11c FITC o PE, anti-CD103 PE, anti-CD11b-FITC para células presentadoras de antígeno y anti-CD4-PerCP o PE y anti-CD8-FITC para linfocitos T, anti -CD117PE, anti-RFCεI para eosinófilos, anti-GR1-FITC para neutrófilos y anti-Tγδ-FITC (Pharmingen, San Diego, CA). Los datos se adquirieron con un citómetro de flujo FACScalibur y se analizaron con CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Marcación intracitoplasmática.

Las ganglios mesentéricos provenientes de ratones tolerantes y tratados con LTC4 (0,01 µM) o no tratados se procesaron según los detallado anteriormente (punto 3.6). Luego, se realizó un gradiente de Ficoll-hypaque para obtener las células mononucleares. Se lavaron exhaustivamente y se cultivaron a una concentración de $1x10^6$ células/pocillo en microplacas de 96 pocillos en RPMI con 10% de SFB, tampón HEPES 10 mM y mercaptoetanol $5{,}5x10^{-5}$ M (Sigma, Argentina). La marcación intracelular para evaluar la producción de citoquinas se realizó después de la estimulación de las células mononucleares durante 24 h con Ova (10ng/ml), en presencia de brefeldina A, las últimas 6 hs. de cultivo. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron

con saponina (0,1% en PBS). Las células permeabilizadas se incubaron con anti-IL17A conjugado con PE, IL-5, TNF-; IL-4 e IFN-γ Abs (BD Pharmingen). En todos los casos, la tinción de la superficie con FITC conjugado anti-CD11c (DC) o PerCP conjugado anti-CD4 (linfocitos T) o anti-CD8-FITC Abs (BD Pharmingen) se realizó antes de la permeabilización. Los datos se adquirieron con un citómetro de flujo FACScalibur y se analizaron con CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Diferenciación de células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea.

Las células dendríticas (CD) derivadas de la médula ósea se obtuvieron como se describió anteriormente (62). En resumen, se cortaron las epífisis de fémures y tibias de ratones BALB/C, y las médulas se lavaron con medio RPMI 1640. Los glóbulos rojos se lisaron utilizando cloruro de amonio al 0,083%. Después del lavado, las células se suspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FCS), $5{,}5 \times 10^{-5}$ ME (Sigma-Aldrich) y 30% de medio condicionado a partir de células J588-GM productoras de GM-CSF y se cultivaron durante 9 días. Cada 2 días, se aspiró el 50% del medio y se reemplazó con medio nuevo que contenía GM-CSF. En el día 9 de cultivo más del 85% de las células recolectadas expresaron MHC clase II, CD40, CD80 y CD11c, pero no Gr-1 (datos no mostrados).

Ensayos de proliferación de células T.

Para los ensayos de proliferación, se sembraron $5x10^5$ células en placas de 96 pocillos que contenían 1μg/ml de Ova. Los cultivos se incubaron durante 3 días con la adición de 1μCi por pocillo de [^{3}H]-timidina durante las últimas 8 horas, y la incorporación se midió por recuento en centelleo líquido. Brevemente, las células se recolectaron en discos de papel de filtro con la ayuda de un recolector semiautomático, y se determinó la incorporación de la timidina en un contador de centelleo beta Winspectral Wallac 1414 (Perkin Elmer, Buenos Aires, Argentina). Los resultados de los cultivos por triplicado o por cuadruplicado se expresan como el índice de estimulación medio ± ES, calculado como recuentos por minuto en cultivos que contienen antígeno en relación a los recuentos en cultivos de control.

Determinación de citoquinas.

Los niveles de citoquinas en las células mononucleares provenientes de los ganglios mesentéricos se midieron por ELISA. Los ensayos de citoquinas se realizaron de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los límites de detección fueron 8 pg/ml para TGF-β y TNF-α, 32 pg/ml para IL-10, 15 pg/ml para IL-12p70, 8 pg/ml para TNF-α, 4 pg/ml para IL-6 y 5 pg/ml para la IL-17.

Caracterización de los pacientes.

Se realizaron biopsias de la mucosa colónica por videocolonoscopía a pacientes con diagnóstico de CU, de acuerdo con criterios de la OMS, y a controles sanos, luego de la firma de un consentimiento informado. El grupo control fue pareado por sexo y edad, y fueron pacientes que realizaron un screening convencional para cáncer colorectal. El proyecto contó con la aprobación de los respectivos comités de ética de ambas instituciones.

Disgregación de las biopsias.

Las muestras correspondieron a cuatro segmentos: colon transverso (CT), derecho (CD), izquierdo (CI) y recto sigmoideo (RS). Los tejidos de la mucosa se dejaron en agitación por 30 minutos a 37ºC en medio F-12+ 5 mM de EDTA. Los sobrenadantes se recogieron y se mantuvieron a 4ºC. El proceso se repitió 4 veces. Finalmente, el pellet celular se cultivó en presencia de F-12+EDTA+colagenasa 10 mg/ml durante 15 min a 37ºC. Finalizado este periodo el sobrenadante se adicionó al previo y se centrifugó 5 min a 1500 rpm. Las células se resuspendieron en medio F-12+25 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 1% de suero fetal bovino (SFB).

Análisis de la expresión de CysLTR1 y CysLTR2 por RT-PCR.

Se extrajo el ARN total de las biopsias, utilizando el reactivo Trizol (Gibco-Life Technologies). La reacción de transcripción reversa (RT) se realizó utilizando 1µg de ARN total. Se utilizaron 50 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega). La qPCR se realizó utilizando SyBRGreen (BioRad). Los primers fueron proveídos por Ruralex Fagos: CysLTR1 Fw 5' TGG CAA TGG CTT TGT GCT CT 3'. CysLTR1 Rv 5' TAG ACC ACA CGG AGA GGC AG 3'. CysLTR2 Fw 5'GGA GAC CTG GCC TGC AGG AT 3'. CysLTR2 Rv 5'CGC ACA ACA CTC AGC ACG GT 3'. GAPDH Fw 5' GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT 3'. GAPDH Rv 5' TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG 3'. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un equipo CFX Connect (BioRad).

Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como medias ± SEM. Para evidenciar diferencias estadísticamente significativas entre dos medias utilizamos el test t de Student. Para comparar tratamientos múltiples se evaluó con ANOVA de un factor seguido del análisis posterior de Tukey o Dunn. Un valor de $p<0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Como mencionamos previamente el epitelio juega un rol esencial en mantener la homeostasis de la mucosa intestinal y la desregulación de los mecanismos de control se asocian al desarrollo de EII (21). La presencia de CD tolerogénicas en esos epitelios es uno de los mecanismos que permiten mantener la no respuesta. En este sentido, Iliev y colaboradores (63) mostraron previamente que las CD, en contacto con las células epiteliales, son capaces de expresar la molécula CD103. Decidimos evaluar sí el LTC4 era capaz de modular la expresión de esta molécula por las CD murinas *in vitro*. Para esto, como se muestra en la Figura 1A, las CD diferenciadas de precursores de médula ósea tratados con o sin LTC4 y MK, se pusieron en contacto con una monocapa epitelial obtenida del intestino delgado de los ratones tolerantes, y se analizaron las características fenotípicas y morfológicas. Después de 48 hs de cocultivo, las CD se hicieron más adherentes cuando se trataron con LTC4, como se evidencia en la Figura 1B, el análisis de citometría de flujo demostró una disminución en la expresión de la integrina CD11c por la CD de aproximadamente el 15% comparado con el control sin estimular. También, encontramos que el LTC4 inhibe la expresión de la molécula CD103 por las CD CD11c+ (en aproximadamente un 30%). Por el contrario, el tratamiento con MK evitó la

adherencia celular y no modificó la expresión de los marcadores de las CD. Luego, al estudiar las citoquinas producidas en los sobrenadantes del cocultivo, sorprendentemente, encontramos una inducción de TNF-α en los sobrenadantes provenientes de cocultivos entre CD-LTC4 y células epiteliales y CD solas (1C).

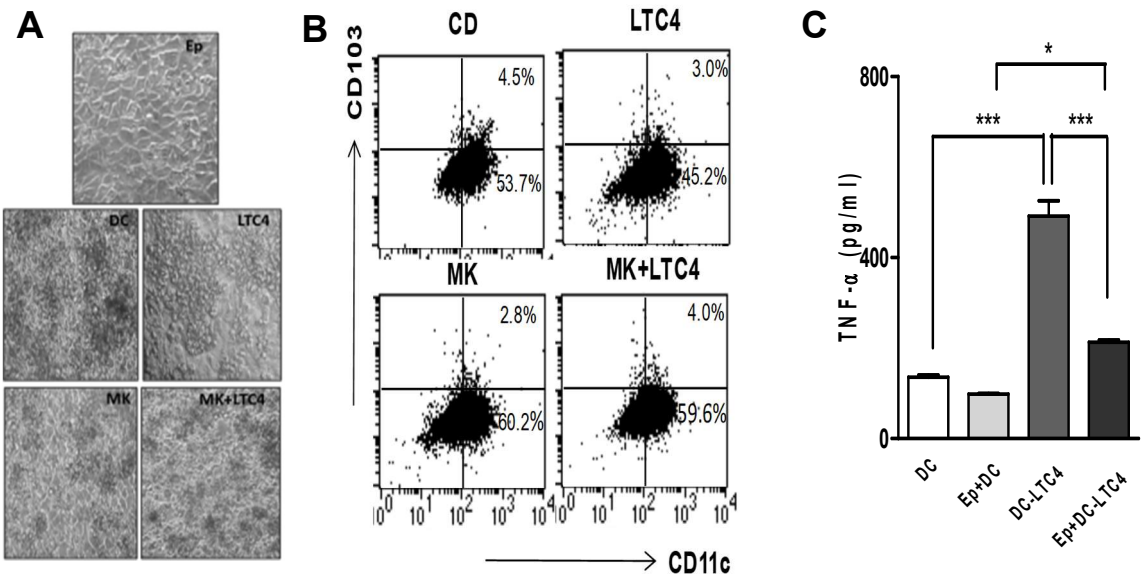


Figura 1: el LTC4 inhibe la expresión de la molécula CD103 por las CD. En A, se muestra una fotografía representativa (aumento original 40 ×) obtenida de cultivos entre monocapa epitelial (Ep) obtenida de intestino delgado murino y CD, B, mediante CD103+/CD11c+ CD expresión obtenida por citometría después de 48 hs de cocultivo entre CD derivadas de precursores médula ósea y una monocapa de células epiteliales. C, las barras representan la concentración de TNF-α expresada como la media (pg/ml) ± media ES de 5 experimentos. Los asteriscos representan la significación estadística utilizando ANOVA de una vía y post-test de Tukey (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

En un trabajo previo, demostramos que una dosis de 0.01 μM de LTC4 induce el pasaje de dextrán-FITC desde la mucosa intestinal a la sangre, lo que indica que este mediador afecta la integridad de monocapa epitelial (55). Decidimos evaluar entonces los mecanismos involucrados en este accionar del LTC4 en un modelo previamente descripto de tolerancia a la ovoalbúmina (Ova) (61). El esquema de trabajo se muestra en la figura 2A. En primer lugar, como se observa en la Figura 2B y 2D, corroboramos la efectividad del modelo luego del tratamiento con Ova, ya que no observamos respuesta celular ni humoral frente al antígeno. Sin embargo, la administración oral de LTC4 indujo una respuesta proliferativa de las células mononucleares provenientes de los ganglios mesentéricos (B) así como la producción de inmunoglobulinas (Igs) específicas (D) frente al antígeno de trabajo, lo que indicaría una ruptura de la tolerancia en presencia de LTC4.

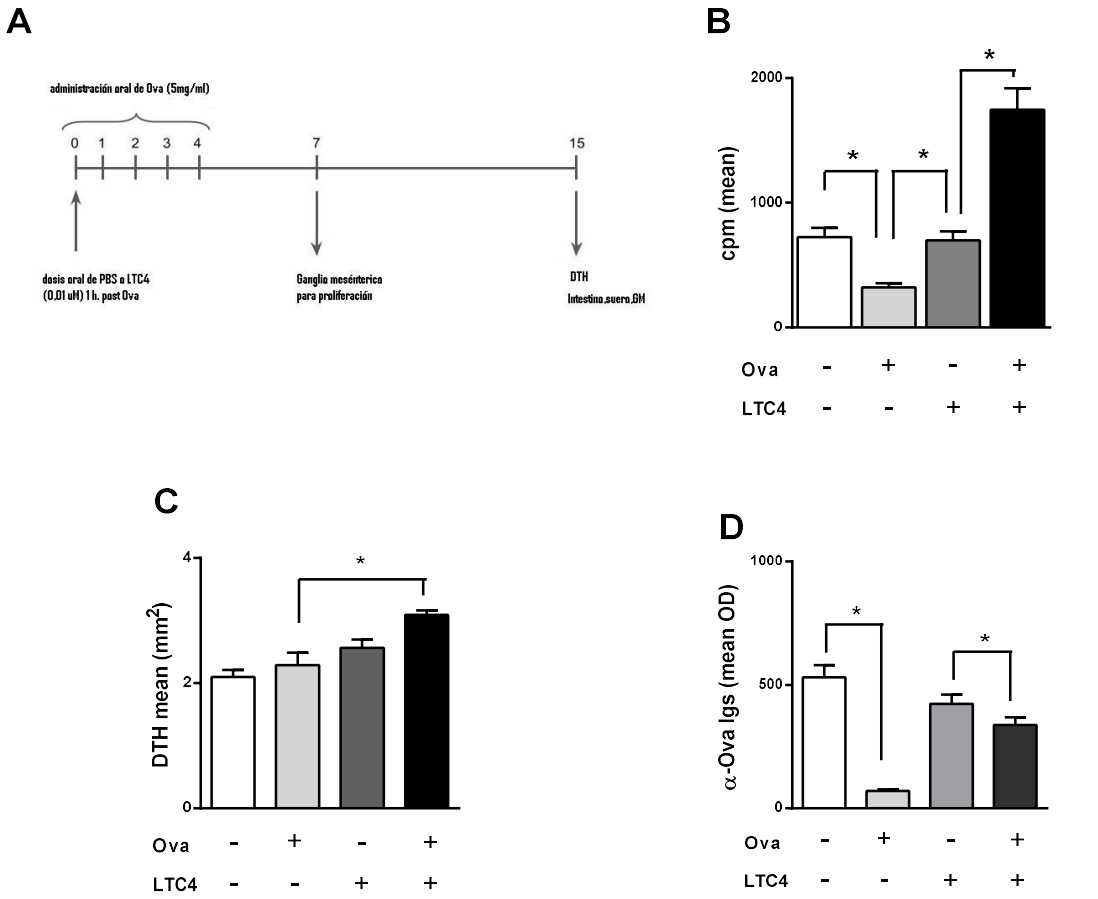


Figura 2: El LTC4 afecta la inducción de tolerancia. A, se muestra un esquema del tratamiento para tolerizar los ratones BALB/c. Después de una semana, se obtuvieron las suspensiones de los GM y se incubaron las células mononucleares in vitro con o sin Ova (1µg/ml) durante 96 hs. Ocho horas antes del final de la reacción, se añadió timidina tritiada al cultivo y se evaluó la respuesta proliferativa (B). En C, analizamos la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), después de 48 horas de inyección subcutánea de Ova (100 µg/20 µl) y PBS en la almohadilla del pie derecho o izquierdo, respectivamente. La hinchazón se midió con un calibre y se expresó como $mm^2 \pm$ ES. En D, todos los grupos se inyectaron subcutáneamente en la almohadilla de la pata con 100 mg de Ova en una solución completa de adyuvante de Freund al 50%.15 días después del desafío, se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola y se analizó el suero para determinar la presencia de anticuerpos IgG específicos mediante ELISA. Las barras muestran la densidad óptica media (DO) ± ES. Los asteriscos indican diferencias significativas (*, $p<0.05$) con el grupo de control o el grupo tratado con Ova, utilizando ANOVA de un factor y post-test de Tukey, n = 6.

Decidimos entonces analizar la morfología de la mucosa intestinal por microscopía luego de una semana de la inoculación oral de PBS o LTC4 a los ratones tolerantes a la Ova. En la Figura 3, se observa que el LTC4 modifica profundamente la estructura del epitelio, lo que se asocia al acortamiento de las microvellosidades e incremento de la protrusión de las células caliciformes (A). Además, se observó edema a nivel de la lámina propia (B), conjuntamente con un marcado reclutamiento de leucocitos, mayormente granulocitos-eosinófilos. Por otra parte, los centros germinales están activados en los

ratones tratados con el mediador, lo que indica que hay proliferación de linfocitos B, asociada a la ruptura de la tolerancia (C-D).

Teniendo en cuenta el papel central de las células dendríticas (CD) $CD103^+$ en la inducción tolerancia en la mucosa (63), decidimos analizar las células presentadoras de antígeno (CPA) en los GM después de 15 días del tratamiento con LTC4. Para esto, obtuvimos suspensiones celulares después de la disgregación de los ganglios linfáticos. En la Figura 3E, mostramos que el tratamiento con el LTC4 incrementó el reclutamiento de CD ($CD11c^+CD103^-$) y DC-macrófagos ($CD11b^+$ $CD11c^+$) al GM mientras que la población de CD ($CD11c^+CD103^+$) no fue afectada por este mediador.

Las suspensiones celulares de GM se re estimularon in vitro con Ova (10 ng/ml), 48 hs después estudiamos la producción de las citoquinas producidas por los linfocitos mediante marcación intracitoplasmática. Como se muestra en la Figura 2F y G, no se observaron diferencias en la producción de IFN-γ, IL-5 o IL-4 por las células T $CD4^+$ en comparación con el tratamiento con PBS, estos resultados están en concordancia con los observados por el grupo de Oliveira y col (4) en un modelo de ratones deficientes en leucotrienos. Tampoco se observaron diferencias cuando evaluamos la producción de IFN-γ y TNF-α en los linfocitos CD8+ obtenidos de ratones tratados con una dosis única de LTC4 versus los ratones tolerantes.

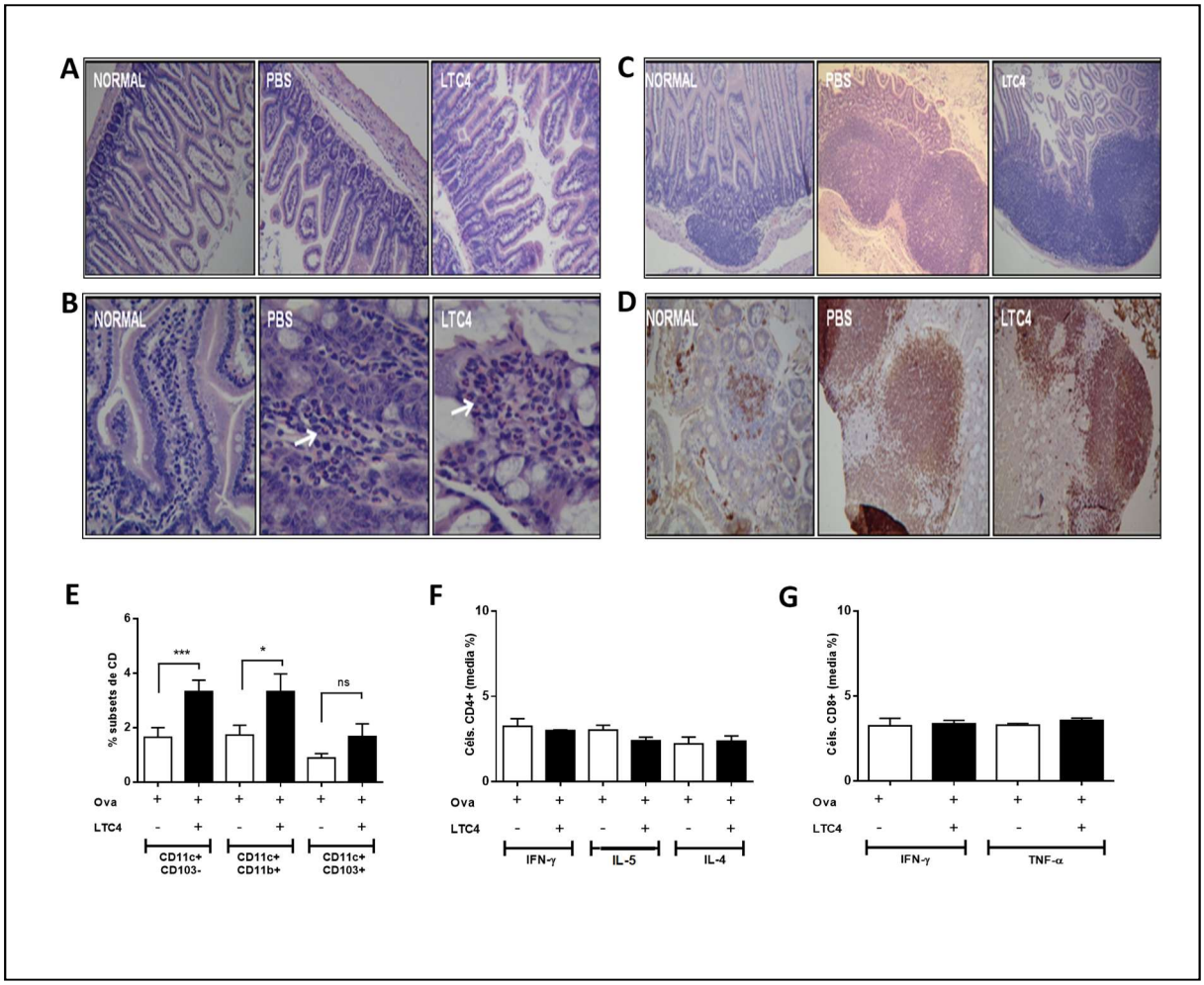


Figura 3: Características morfológicas del intestino delgado y fenotipo mesentérico. Se observa una muestra representativa del intestino proveniente de ratones normales, tratados con Ova (PBS) o tratados con Ova-LTC4 (LTC4). En A, las microvellosidades se encuentran a nivel del epitelio simple del intestino. El LTC4 indujo un engrosamiento prominente de las vellosidades epiteliales. En B, las flechas indican el reclutamiento de eosinófilos en la lámina propia. C, se muestra la estructura de las placas de Peyer con centros germinales activos. En D, una inmunohistoquímica representativa que utiliza el anticuerpo monoclonal CD20 evidencia la proliferación de linfocitos B en los centros germinales. A, B, C: los cortes se tiñeron con H&E. Ampliación original 200 × (A, B), 100 × (C, D). Luego, analizamos en células mononucleares obtenidas de GM después de 15 días, las poblaciones de células presentadoras de antígenos y los linfocitos reclutados en el tejido después del tratamiento. Mostramos los porcentajes de células CD11c+ CD103+ y CD11b+ (E), % de CD4 productoras de citoquinas (F) y CD8 (G) T. Los asteriscos representan la significación estadística (*, $p<0.05$; ***, $p<0.001$) utilizando ANOVA de una vía y post-test de Tukey, $n = 3$.

A continuación, decidimos estudiar la expresión de los receptores para los CysLT en el intestino delgado. Como se muestra en la Figura 4, la expresión del receptor de tipo 1 no se vio afectada por la tolerancia oral y los niveles de este receptor son similares en ratones normales y tolerantes (A, C). Lo mismo se observó con respecto a la expresión del CysLTR2 (B, D). Dado que probamos que CysLTR1 se expresa en cantidades más altas, así como su implicación en la génesis de las respuestas inflamatorias de la mucosa (65), decidimos evaluar el papel del montelukast, el antagonista de dicho receptor en la morfología intestinal. El esquema de inoculación se muestra en la Figura 5A. En el día 14, evaluamos el tejido intestinal de los ratones tratados con MK mediante inmunohistoquímica y encontramos cambios morfológicos correspondientes a acortamiento y ensanchamiento con bordes serrados e infiltración mononuclear (5Bi). Por otro lado, el infiltrado de granulocitos-eosinófilos disminuyó considerablemente en los ratones que recibieron MK en comparación con los ratones tratados con LTC4 (Figura 5Bii). A continuación, analizamos la población de leucocitos mediante citometría de flujo en suspensiones de intestino delgado. La Figura 4 muestra que el tratamiento oral con LTC4 indujo un aumento en los neutrófilos (5C) y el reclutamiento de mastocitos (5D). Además, el análisis mostró un aumento en el porcentaje de células dendríticas inflamatorias (CD11c+ CD11b+), tanto en ratones tratados con LTC4 como con MK (5E). Frente al tratamiento con LTC4, MK indujo un aumento en la población de linfocitos Tγδ+, posiblemente asociado al daño inducido a nivel de la mucosa (66) (F).

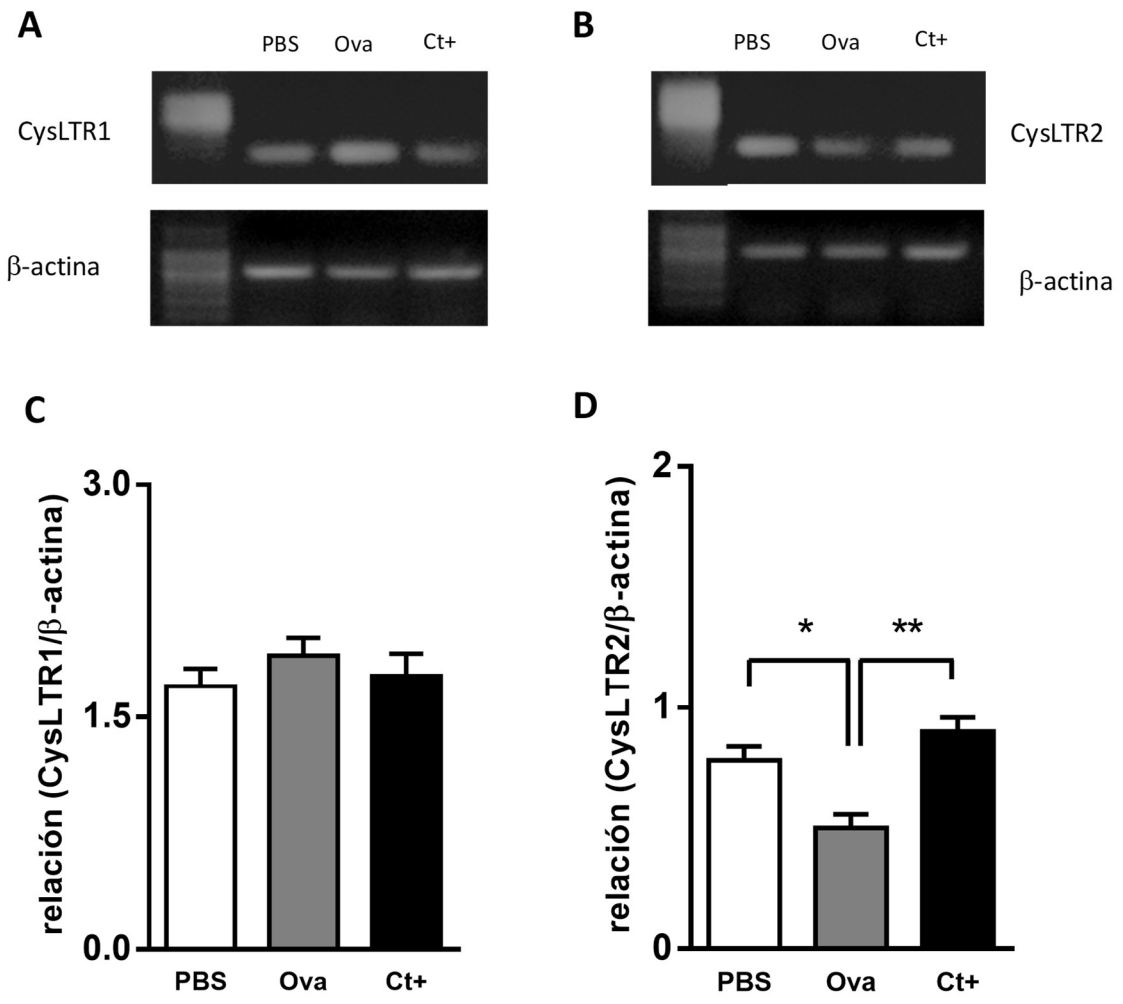


Figura 4: Expresión intestinal de receptores de los CysLT. La expresión de los receptores CysLT1 y CysLT2 se evaluaron mediante RT-PCR. Se obtuvieron los intestinos delgados de los ratones tolerantes tratados (LTC4) o no tratados (PBS) para extraer los ARN. Se usaron ARN de pulmón y colon como controles positivos para el CysLTR1 (A) y el CysLTR2 (B), respectivamente. A y B, se muestran geles RT-PCR representativos de 4 experimentos independientes. C y D, los gráficos de barras de para los valores de relación obtenidos de la normalización de cada banda de intensidad en comparación con β-actina. Los resultados se expresan como las relaciones y representan la media aritmética ± media ES de 4 experimentos. Los asteriscos representan una significación estadística al usar ANOVA de una vía con post-test de Tukey (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$) vs. grupo PBS.

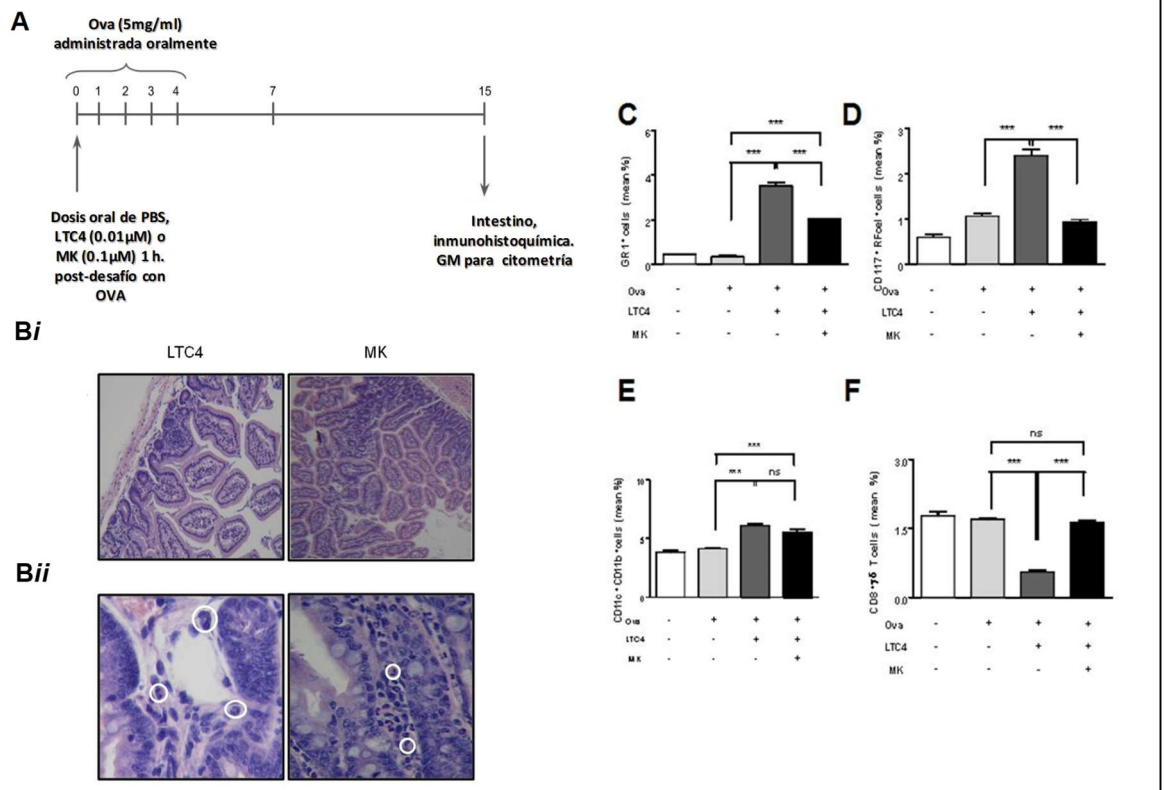


Figura 5: Los efectos inflamatorios están parcialmente asociados con CysLTR1. En A, se muestra un esquema de inoculación. B*i*-B*ii*, estructura histológica del epitelio intestinal. Los histogramas C-F representan los porcentajes de células positivas para los siguientes marcadores: C, neutrófilos (GR1+); D, mastocitos (CD117+ RFCεI+); E,CD (CD11c+ CD11b+); F, linfocitos intraepiteliales (CD8 γδ+). Las barras representan la media aritmética±media ES de 6 experimentos. Los asteriscos representan significación estadística utilizando ANOVA de una vía con post-test de Tukey (***, p <0.001) vs. PBS.

Muchos mecanismos podrían explicar la interferencia del LTC4 con la tolerancia oral. Para un análisis en profundidad, se procesó el GM para el análisis de citoquinas. Como se muestra en la Figura 6A, el LTC4 inhibió la secreción de citoquinas anti-inflamatorias TGF-β e IL-10 en comparación con los niveles observados en ratones tolerantes, aunque el uso de MK solo revirtió la acción de LTC4 sobre la producción de IL-10 sin afectar la al TGF-β. En la Figura 6B, también se debe tener en cuenta que, aunque el MK disminuye significativamente la proliferación de linfocitos en respuesta a la Ova en comparación con el LTC4, este antagonista no puede revertirlo por completo, lo que indica que esta función en los linfocitos podría ser modulada por otro receptor de los CysLT.

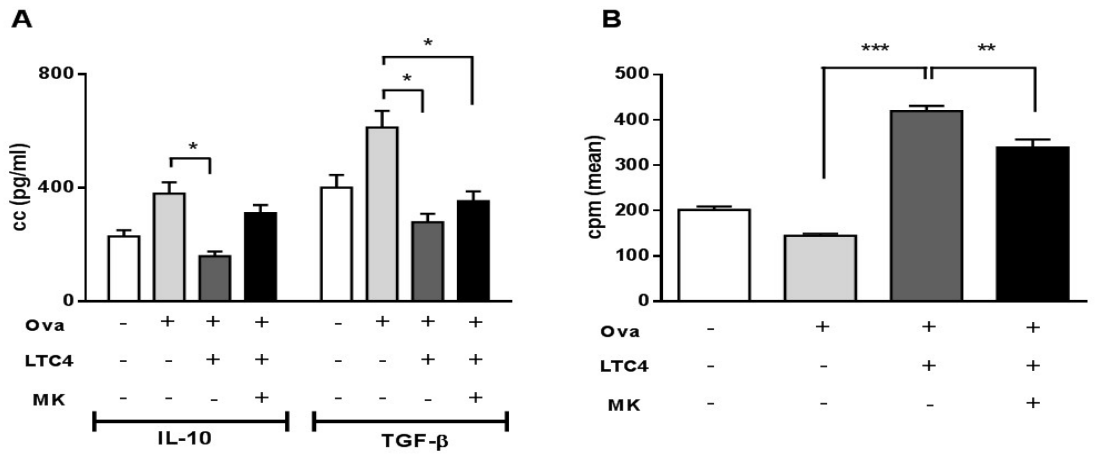


Figura 6: El antagonista selectivo del CysLTR1; MK revierte parcialmente la ruptura de la tolerancia. A, secreción de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF-β en los ganglios linfáticos en presencia o ausencia de MK (0.1μM). B, análisis de la proliferación de células T a partir de los GM en presencia o ausencia de MK. Anova con post-test de Tukey. *, p<0,05; **, p<0.01; ***; p<0,001.

Objetivo 2: Evaluar la correlación entre los niveles de LTC4 y el establecimiento de una respuesta inflamatoria.

Se incluyeron en el estudio 12 pacientes de 49.8 años de edad promedio (21-72), seis mujeres y seis varones. Nueve pacientes con diagnóstico de Colitis Ulcerosa, dos Enfermedad de Crohn y un paciente con superposición CU-EC. Las características clínico-demográficas de los pacientes se muestran en tabla 1. El tiempo promedio de diagnóstico de la enfermedad al momento del estudio fue de 9.75 años (2-30). Seis de los doce pacientes tenían manifestaciones extraintestinales de la EII, todos con diagnóstico de CU. Los 12 controles sanos tuvieron una edad promedio de 50.5 años (19-70), siete mujeres y cinco varones. Las características de los mismos se muestran en la **tabla 1**:

Paciente	Sexo	Edad	Año Diagnóstico	Diagnóstico	Mayo Score VCC	Manifestaciones intraintestinales	Anticuerpos anti-nucleares	Tratamiento
1	F	72	1987	CU	3	Sicca, Artritis	-	Mesalazina
2	F	67	2000	CU	3	-	-	Mesalazina
3	M	52	2012	CU	2	Hepatitis autoinmune, Psoriasis	+	Mesalizina, Etarnecept, UDS
4	M	58	2011	Crohn	3	-	-	Mesalazina
5	M	63	2015	CU	3	Linfoma No Hodgkin	-	Mesalazina
6	M	48	1994	CU	2	Artritis	-	Mesalazina, infliximab, 6-mercaptopurina
7	F	41	2013	Crohn	2	-	-	Mesalazina, esteroides
8	M	61	2003	CU	2	Artritis	-	Mesalazina, Adalimumab
9	F	55	2014	CU	2	Acné, Pustulosis	+	Mesalazina
10	F	60	2014	CU	2	-	-	Esteroides
11	F	42	2009	CU+Crohn	3	-	-	Mesalazina
12	M	21	2015	CU	3	-	-	Mesalazina

Uno de los rasgos salientes de las EII es la pérdida de la homeostasis de la mucosa (21), además del aumento de mediadores lipidícos (39,40). Teniendo en cuenta nuestros resultados en el modelo murino, durante la segunda etapa de este trabajo, estudiamos en biopsias humanas la correlación de la expresión del LTC4 con la respuesta inflamatoria en pacientes con EII.

En primer lugar, analizamos las poblaciones de leucocitos reclutadas en las biopsias por citometría de flujo luego de su disgregación como se indica en la sección de materiales y métodos. En general, las biopsias procedentes de pacientes con EII, como era de esperarse, presentaban un número total de células mayor respecto de los controles sanos. El análisis a nivel de las poblaciones presentes en el tejido demostró en primer lugar que este mayor número celular no estaba asociado a un mayor reclutamiento de células presentadoras de antígeno (CPA; CD11a+CD11b+) (Figura 7A).

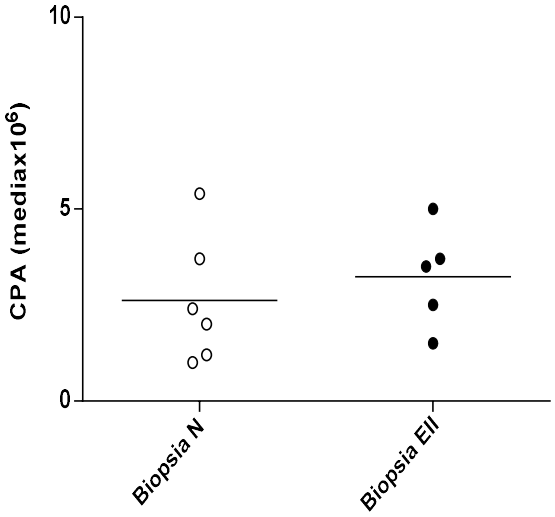


Figura 7: Los pacientes con EII no presentan un mayor número de células CD1a+CD11b+ en las biopsias de colon. El gráfico de puntos muestra el número de presentadoras de antígeno, evaluado por citometría de flujo. T-test de Student, n=4-6

Los pacientes con EII presentaron un número mayor de neutrófilos (Figura 8 A y B), además encontramos que estas células estaban menos activadas que la de los controles sanos, ya que presentaban una mayor expresión de la adhesina L-selectina (Figura 8D).

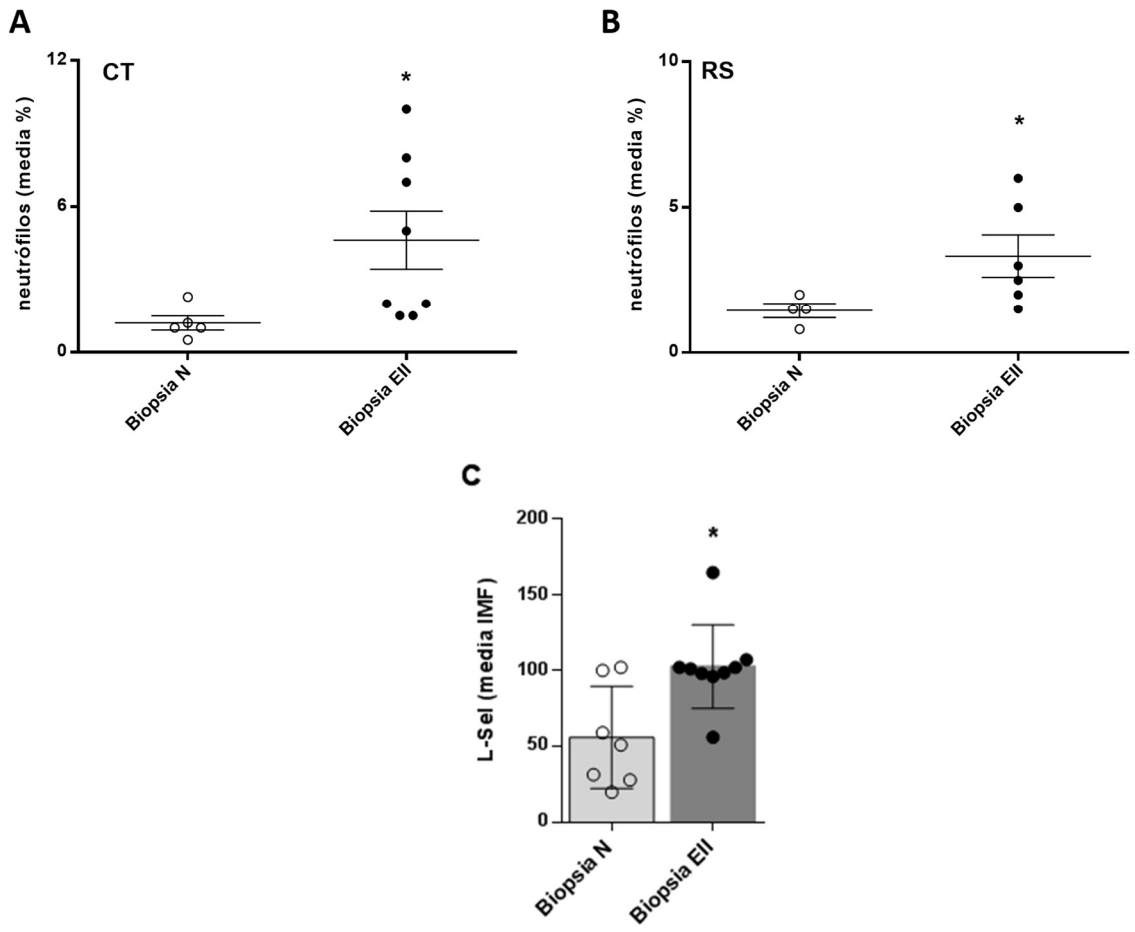


Figura 8: Los pacientes con EII presentan mayor número de neutrófilos. Los puntos muestran los valores de neutrófilos en cada muestra, correspondientes a los segmentos CT (A) y Rs (B). El gráfico de barras muestra la media de intensidad de fluorescencia ± media ES para la L-selectina expresada en los neutrófilos (C). T test de Student, * $p < 0.05$

El análisis de citoquinas muestra que la IL-8 está incrementada en los sobrenadantes de cultivo provenientes de pacientes con EII (figura 9), mientras la IL-12 no se alteró ni en los controles normales ni en los pacientes en ningún segmento evaluado.

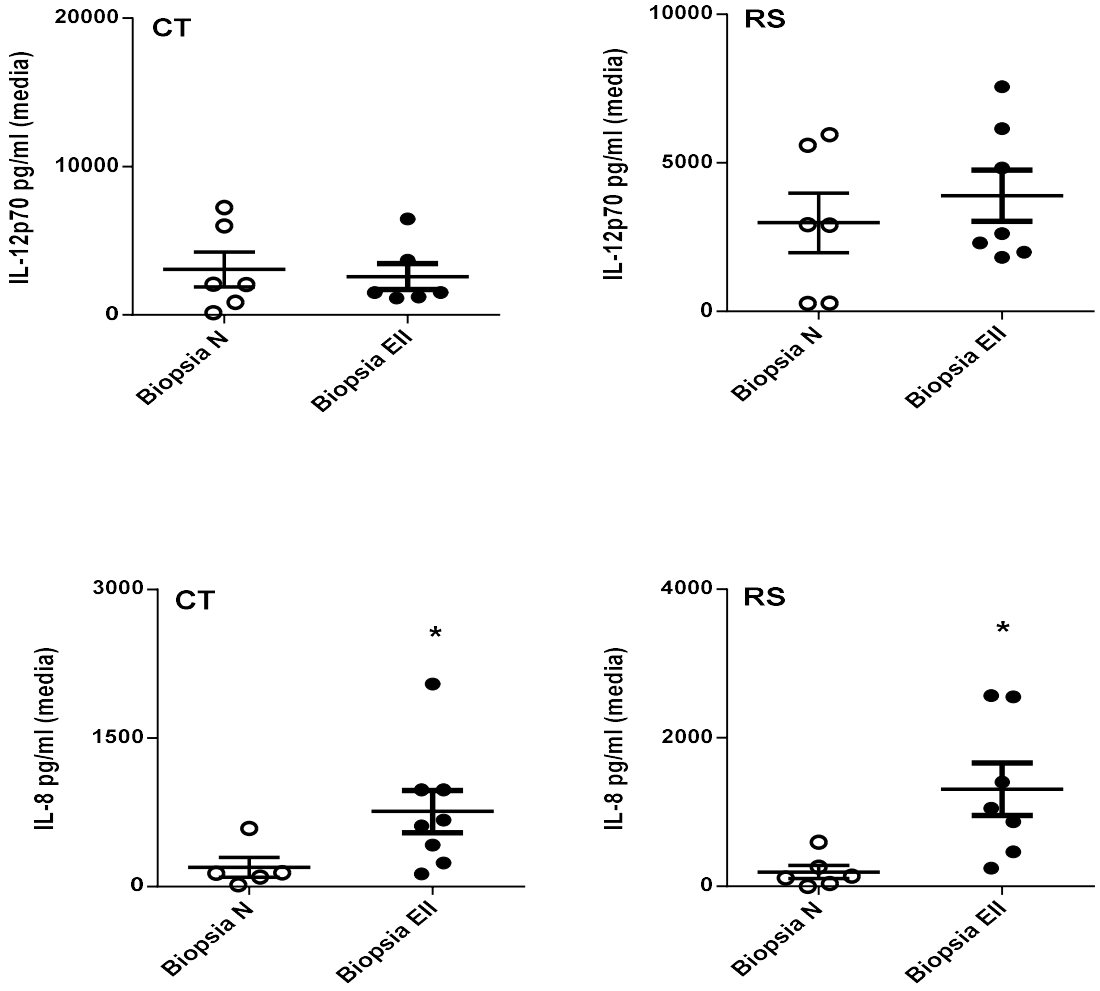


Figura 9: Los pacientes con EII presentan una mayor concentración de IL-8. Las citoquinas IL-12p70 y la IL-8 se evaluaron por la técnica de ELISA 24 hs post-procesamiento de las biopsias. T-test de Student. *, $p<0,05$

Teniendo en cuenta que un incremento del LTC4 se reportó en varias patologías inflamatorias que afectan a la mucosa (58), decidimos analizar este punto. Como se muestra en la Figura 10, los niveles de LTC4 en los sobrenadantes de pacientes con EII se encontraron excesivamente elevados.

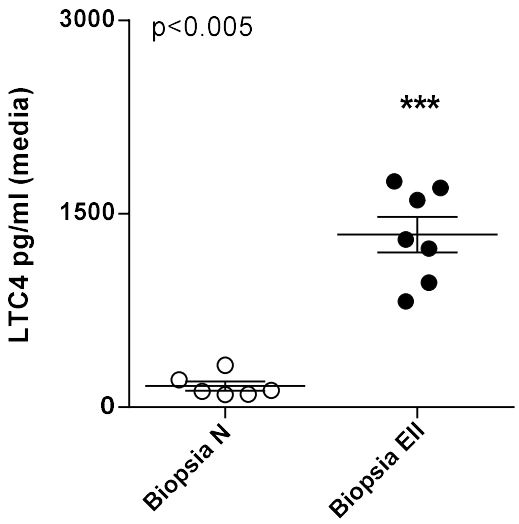


Figura 10: Cuantificación de LTC4 en las biopsias. La medición del LTC4 se hizo en sobrenadantes de cultivo de las biopsias 24 hs después de su procesamiento. La cuantificación se hizo por ELISA. T-test de Student. ***, p<0,001.

Para evaluar la relevancia de estos resultados analizamos finalmente la correlación del LTC4 y/o sus receptores en los parámetros inflamatorios analizados. Llamativamente encontramos que el LTC4 correlaciona positivamente con los niveles de IL-8, principal quemoquina para el reclutamiento de neutrófilos (Figura 11).

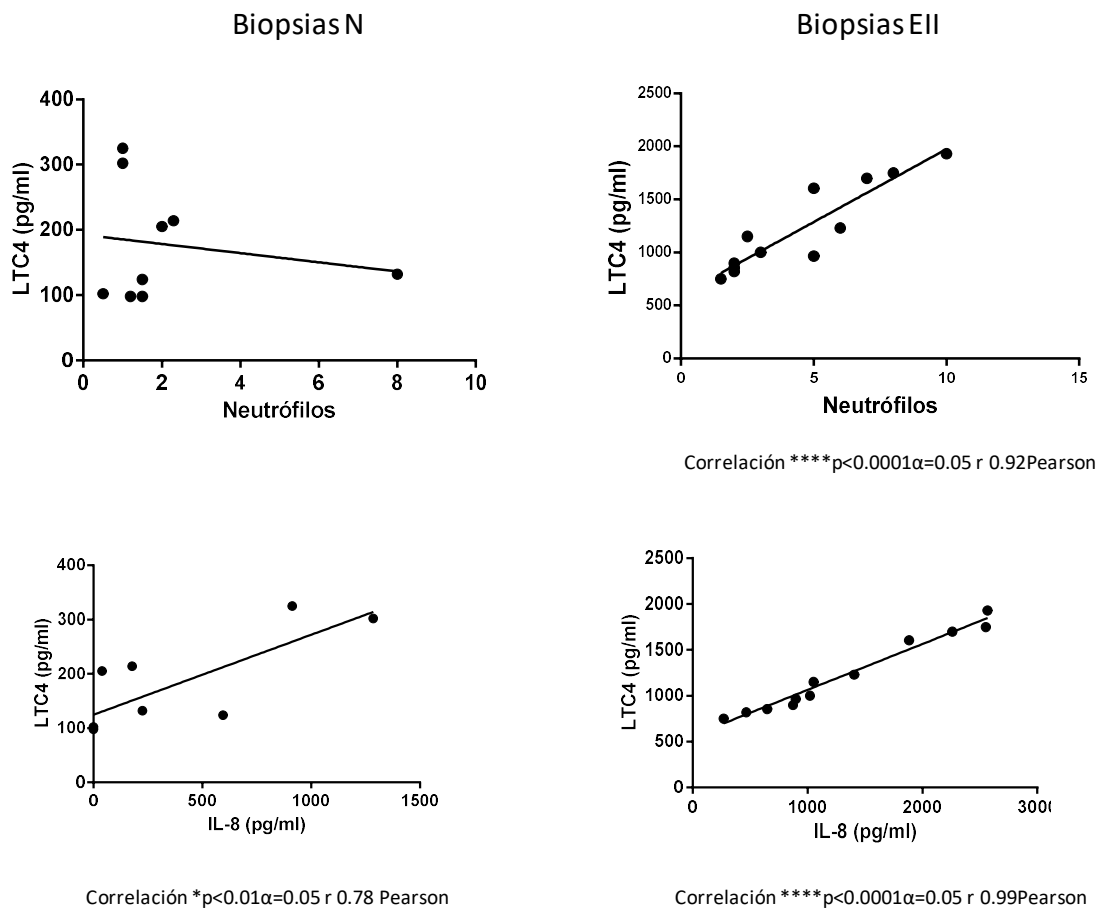


Figura 11: Estudio de la correlación entre el LTC4 y los signos de inflamación. Se informan los coeficientes de correlación de Pearson en cada caso.

Para finalizar evaluamos en los pacientes con EII si existía asociación entre los parámetros medidos y las manifestaciones extraintestinales (MEI, ver tabla 1). Como se observa en el gráfico 12, en los pacientes con MEI se observaron los niveles más elevados de IL-8 y de LTC4 y la asociación más potente con el desarrollo de la MEI.

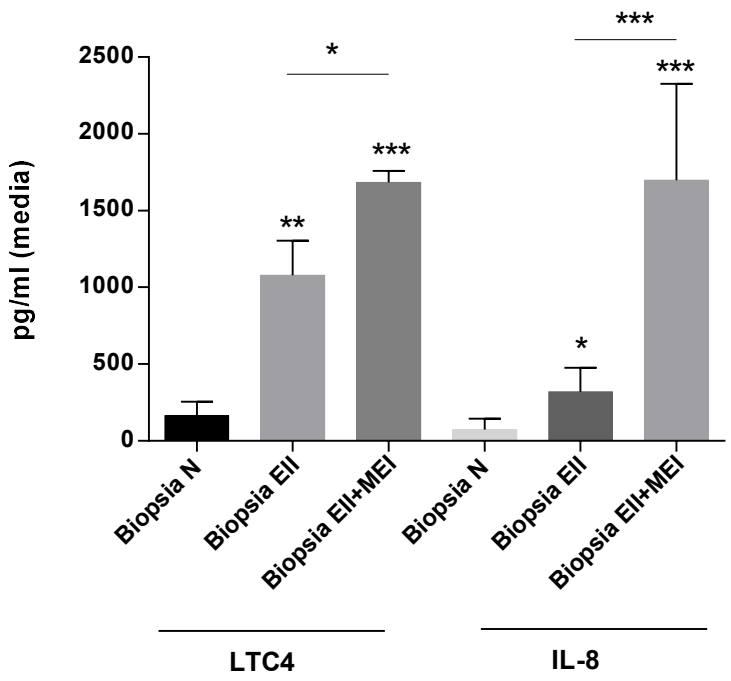


Figura 12: Asociación entre los niveles de LTC4 y IL-8 con la ocurrencia de MEI. Los pacientes se compararon con las biopsias normales por ANOVA y post-test para comparaciones múltiples de Dunn. *p<0.05; **p<0.001; **p<0.0001.

DISCUSIÓN

La secreción de cisteinil leucotrienos y la expresión de sus receptores están profundamente asociadas a trastornos inflamatorios como la gastritis o la fibrosis quística (67,68). Anteriormente, demostramos que el LTC4 al interactuar sobre las CD murinas interfiere con su maduración e induce la secreción de IL-23 activando la polarización de los linfocitos TCD4+ en un perfil Th17 in vitro (62). Esto podría explicar parcialmente la génesis de las enfermedades inflamatorias asociadas con el reclutamiento de neutrófilos, donde los niveles de LTC4 o sus receptores aumentan excesivamente (69,70). En este trabajo, en primer lugar, analizamos la capacidad de una dosis de 0.01 μM de LTC4, descrita previamente por nosotros y por otros grupos como efectiva tanto in vivo como in vitro para modular la respuesta inmune (55,71,72), para afectar la inducción de tolerancia. Curiosamente, nuestros resultados muestran que la administración oral de LTC4 a ratones al inicio de la tolerización a la Ova, interfiere con este mecanismo. Asimismo, el LTC4 incrementa el reclutamiento de células efectoras inflamatorias a nivel de la mucosa. Demostramos que los leucocitos granulocitos-eosinófilos eran las principales células reclutadas a nivel de la mucosa. En este sentido, se ha documentado ampliamente que los CysLTs actúan como quimioatractantes de eosinófilos, aumentando a su vez su supervivencia (73,74). En concordancia con nuestros resultados, se demostró que los CysLTs promueven respuestas inflamatorias asociadas al aumento excesivo de granulocitos-eosinófilos, que afectan principalmente a la mucosa intestinal y gástrica (69,73). Cabe destacar que demostramos que el LTC4 afecta la morfología del epitelio

intestinal, lo que se manifiesta a través del acortamiento de las microvellosidades y una disminución en las proporciones de linfocitos TCD8+γδ, asociados al mantenimiento de la integridad epitelial (75-77).

Ha sido extensamente descripto que la disfunción de la barrera epitelial predispone al desarrollo de muchas enfermedades de etiología inflamatoria, como la alergia alimentaria, la EII y la enfermedad celíaca, fenómeno que se acompaña con la alteración de la morfología epitelial induciendo cambios en la permeabilidad (78,79). En un modelo de gastritis, Ahmed y col. mostraron que el daño en la mucosa gástrica inducido por H. pylori se correlaciona con una exacerbación de los niveles de LTC4 (68). En este sentido, Lagunas y col. observaron, en la línea intestinal humana Caco-2, que el LTD4 induce la ruptura de la barrera epitelial a través de la alteración de la permeabilidad paracelular, que se ha descrito como una condición central para el inicio y/o la perpetuación de enfermedades gastrointestinales (51). En esta misma línea, la presencia de LTC4 en los tejidos de la mucosa durante la infección por la bacteria E. coli, que produce un deterioro de la permeabilidad, podría facilitar el paso de toxinas al torrente sanguíneo, causando, por ejemplo, la infección por la toxina Shiga (55).

Cabe señalar que un estudio reciente en un modelo de tolerancia oral desarrollado en ratones 5-LO-KO no afecta su capacidad para producir IFN-γ e IL-5 (47) después de la inmunización con Ova absorbida en hidróxido de aluminio. En nuestro modelo de tolerancia oral no encontramos una modulación de estas citoquinas en la población de linfocitos T analizada. Es posible que el sitio de inoculación y la concentración de antígeno sean responsables de las diferencias observadas (80). Además, el equilibrio de la homeostasis de la mucosa depende de la acción/inducción de muchos actores inmunes: células T reguladoras, citoquinas (TGF-β, IL-10) y CD (CD103+) (81), entre otros. Encontramos una disminución en el porcentaje de las CD CD103+ cuando el LTC4 interfirió con el desarrollo de la tolerancia. Este subtipo de CD es responsable de la activación del perfil tolerogénico en los tejidos de la mucosa (82). Las patologías como las enfermedades celíacas se caracterizan por los altos niveles de mediadores lipídicos, como las prostaglandinas y los leucotrienos, que se correlacionan en general con el daño epitelial asociado a las mismas (81).

En concordancia con estos resultados, encontramos atrofia de las vellosidades y edema inducido por LTC4 en la mucosa epitelial. Cabe destacar que en las biopsias de pacientes celíacos se demostró la acumulación de CD inflamatorias $CD11c^{+}$ $CD103^{-}$ (82). Por lo tanto, suponemos que la presencia de LTC4 en los tejidos de la mucosa podría interferir con la homeostasis normal a través de la liberación de TNF-α, un mediador inflamatorio central asociado al daño epitelial. Como se demostró anteriormente, el LTC4 induce la producción de TNF-α por las CD (62), efecto que se anula en presencia de células epiteliales, aunque sin llevarlo a los niveles de referencia. Esto nos permite inferir que, en ausencia de daño, el epitelio desempeña un papel central en el control de la tolerancia oral a los antígenos solubles.

El análisis de las citoquinas antiinflamatorias en el modelo murino (IL-10, TGF-β) muestra que los niveles fisiológicos de LTC4 pueden revertir el equilibrio de citoquinas que media la tolerancia oral (83,84) en la mucosa intestinal, convirtiéndolo en un perfil puramente inflamatorio. Como resultado, se inducen linfocitos $CD4^{+}$ $IL\text{-}17^{+}$ y se reclutan neutrófilos en la mucosa. En un modelo de encefalomielitis autoinmune experimental (85), que se asocia con el reclutamiento de células inflamatorias en el sistema nervioso central, se demostró que al bloquear el CysLTR1 con el MK se reduce la infiltración de

las células inflamatorias, en particular los perfiles T CD4+ (Th1, Th17), y que utilizando LTD4 se revierte este efecto. Si bien el LTD4 en este modelo no indujo la diferenciación de las células T inflamatorias, sí aumentó la producción de la interleuquina IL-17 por las células T específicas contra la mielina. Recientemente, se encontró evidencia directa de que los LT (tanto LTB4 como CysLT) actúan como quimioatractantes para los linfocitos Th17 al menos a nivel del sistema nervioso central (86). De hecho, la expresión del CysLTR1 se mostró tanto en células epiteliales intestinales normales como en células tumorigénicas (45), mientras que la expresión del CysLTR2 se asocia principalmente a los tejidos del colon (54). En nuestro modelo, en el intestino delgado de los ratones encontramos expresados ambos receptores, aunque la proporción de expresión fue mayor (aproximadamente 50%) para el CysLTR1. Por lo tanto, concluimos que los signos de daño/infección que involucran la liberación de LTC4 pueden ser percibidos por las células epiteliales y/o por las CD de la mucosa induciendo una respuesta inflamatoria local temprana junto con la migración de las CD al ganglio mesentérico con la subsiguiente activación de los linfocitos T vírgenes (87). Si bien demostramos que el uso de MK revierte algunos de los efectos inmunes asociados con el LTC4, este antagonista mostró un fuerte efecto sobre la morfología del epitelio ya que condujo al acortamiento de las vellosidades y el reclutamiento de leucocitos inflamatorios como los granulocitos-eosinófilos, lo que sugiere un efecto adverso en la mucosa intestinal. En este sentido, se demostró que pacientes que toman MK como paliativo para las reacciones alérgicas presentan un gran reclutamiento de eosinófilos en el hígado (88,89). Además, nuestros resultados en el modelo murino nos permiten inferir que los efectos asociados con el LTC4 en la mucosa intestinal dependen de sus acciones en ambos receptores CysLT1 y CysLT2. Estudios futuros nos permitirán determinar el papel preciso de ambos receptores en las patologías inflamatorias que afectan el intestino.

Para determinar el exacto rol del LTC4 en el daño asociado a las EII, decidimos evaluar los síntomas inflamatorios principales de estas patologías. Demostramos que en pacientes con diferentes grados de EII, el número de neutrófilos y de IL-8 se ven aumentados significativamente tanto en el colon transverso como en el recto sigmoideo. La fisiopatología de la enfermedad involucró los dos componentes del sistema inmune: tanto el innato como el adaptativo. Se acepta generalmente que el paso inicial es el reclutamiento inflamatorio de leucocitos, fundamentalmente neutrófilos, que a través de la activación del ácido araquidónico inducen daño epitelial (90). Por lo tanto, el aumento de neutrófilos generalmente se observa en las biopsias de estos pacientes (91,92). Mostramos el aumento tanto de los neutrófilos como de la citoquina principal asociada a su migración (93); La IL-8. Por primera vez probamos una correlación directa entre la secreción de IL-8 y los niveles de LTC4. Por otro lado, no observamos la producción de IL-12 en estos pacientes. Como ya se mencionó, las principales entidades de la EII, la enfermedad de Crohn (EC) y la UC, se diferencian en la polarización de los linfocitos T. Mientras que la EC está relacionado con una respuesta Th1/Th17, la CU que es el mayoritario de nuestras biopsias muestra un perfil Th2 (4,5).

Todos los pacientes estudiados fueron tratados con mesalazina, una terapia de primera línea conocida para las formas leves y moderadas de la EII (94). Su estructura está relacionada con los salicilatos, de hecho, su metabolito activo es el 5-amino-salicilato. Sin embargo, a pesar de que este tratamiento reduce los síntomas inflamatorios (95) o la recurrencia de la CU (96,97), no está claro a través de qué mecanismos se interfiere con la respuesta inmunitaria. En los primeros trabajos se asoció a la inhibición de la cascada del ácido araquidónico (AA) que se asocia al reclutamiento de leucocitos (98,99),

mientras que otros demostraron que su función está relacionada con la captación de radicales libres lo que reduce el potencial oxidativo de los leucocitos (100).Curiosamente, nuestros resultados mostraron que la cascada del AA no se ve afectada por el fármaco al menos en relación con la vía 5-LOX, ya que los pacientes con EII presentan niveles del LTC4 incrementados. Hasta el momento, no hay trabajos que hayan evaluado los niveles de CysLT después de la administración oral de mesalazina. Por otra parte, varios trabajos demostraron que la inhibición de las prostaglandinas y los LTs no es absoluta, y su eficacia depende tanto de la dosis (101) como del sexo (102). En este sentido, Neprasova y col. (103) demostraron que en la nefritis asociada al daño renal los niveles de LTC4 y sus metabolitos están elevados por lo que los autores sugieren la medición de los niveles de este mediador en muestras de orina o suero como biomarcadores de la enfermedad, evitando así métodos invasivos de exploración. Este fenómeno es muy interesante ya que el uso de mesalazina en pacientes de EII se informó como inductor de nefritis intersticial (104-106), lo que podría en parte estar asociado a la producción de leucotrienos. Asimismo, En un modelo experimental de autoinmunidad, Santoro y colaboradores (107) demostraron que los macrófagos de ratones MRL -*lpr/lpr* (lupus murino) presentan un metabolismo aberrante del ácido araquidónico, produciendo niveles elevados de LTC4 diez veces respecto de los ratones normales en ausencia de estímulos exógenos. El incremento espontáneo en la producción de LTC4 fomentó la síntesis de ADN por los queratinocitos epidérmicos, la proliferación de fibroblastos en cultivo, la mitogénesis de células epiteliales glomerulares humanas e inhibió la activación de linfocitos efectores Th1.

Actualmente, la única manera de monitorear la actividad de la EII no endoscópicamente es a través del dosaje de los niveles de calprotectina en materia fecal. Por ello, creemos que futuros ensayos nos permitirán evaluar en pacientes con EII sí los niveles de LTC4 en suero o en materia fecal podrían utilizarse también como marcador de actividad de la enfermedad, prolongando los periodos entre controles endoscópicos para evaluar la progresión de la enfermedad. Si bien se debería evaluar si esto permitirá evaluar también el desarrolló de cáncer de colon que suele afectar a las personas que sufren particularmente CU.

Una característica asociada a los pacientes con EII es la presencia de manifestaciones extraintestinales (MEI) relacionada con la inflamación de larga data (108). Estas pueden ser definidas como entidades inflamatorias causadas por el mismo proceso que comanda la inflamación intestinal, pero cuya localización es externa al mismo (109). Desde una perspectiva mecanística, pueden ser clasificadas como: 1) específicas -que representan a la misma EII, como es el caso de la EC metastásica EC mucocutánea-, 2) reactivas -aquellas que comparten los mismos mecanismos patogénicos, sin exhibir las mismas características histológicas, 3) asociadas, cuyo nexo fisiopatológico no es claro, aunque son observadas más frecuentemente entre estos pacientes que en controles y 4) inducidas por el tratamiento, que muestran una relación temporal con el tratamiento de la EII, y desaparecen al cesar el mismo (109). La fisiopatología de las MEI se corresponde con distintos mecanismos inherentes a la evolución de la EII: la interacción de células presentadoras de antígenos con linfocitos T CD4+, con activación de macrófagos, producción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF-α; los linfocitos Th1 y Th17 son activados en el intestino, alojándose luego en tejido sinovial y dando lugar a la respuesta inflamatoria a nivel osteo-articular, por reclutamiento de neutrófilos. La interacción tanto específica como no específica entre estos linfocitos y la célula endotelial, genera ese alojamiento dirigido de linfocitos activados hacia diferentes

órganos, promoviendo la inflamación en sitios extraintestinales. Otro mecanismo propuesto, es una alteración en la inmunidad celular: en la función de neutrófilos (pustulosis, síndrome de Sweet y pioderma gangrenoso) e hipersensibilidad tipo IV en el eritema nodoso (109).

Las MEI encontradas en nuestro grupo de pacientes corresponden a las formas tanto reactivas (artritis, pioderma gangrenoso) como asociadas (sicca, hepatitis autoinmune). Como mostramos en la figura 12 encontramos una fuerte correlación entre los niveles de LTC4, IL-8 y el porcentaje de neutrófilos en los pacientes con EII, lo que fue independiente del score endoscópico y del tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad. Llamativamente encontramos una correlación positiva entre los niveles de LTC4 e IL-8 y la presencia de artritis como manifestación extraintestinal de la EII, todos ellos con CU. El tratamiento de la enfermedad de base no tuvo aparente relación con la ocurrencia de MEI. Podría inferirse que, en este pequeño grupo de pacientes, el curso de las MEI fue independiente de la actividad y de la efectividad del tratamiento de la EII de base.

CONCLUSIÓN

A través de este trabajo, demostramos en un modelo murino, que el LTC4 al impactar en la mucosa intestinal puede interferir con algunos aspectos de la homeostasis, induciendo una respuesta inflamatoria asociada a la alteración de la morfología normal del epitelio y al incremento de leucocitos granulocitos eosinófilos. Llamativamente, estos resultados se corroboraron en parte en biopsias de pacientes con colitis ulcerativa, en los que se encontró una mayor expresión de LTC4 en comparación con las biopsias obtenidas de pacientes normales, hecho que correlacionó positivamente con el incremento de neutrófilos y su quemoquina principal la IL-8. Asimismo, encontramos una asociación marcada entre los niveles del LTC4 y la interleuquina IL-8 y el desarrollo de MEI. Nuestros resultados, podrían a futuro permitir un mejor manejo de las terapias actuales. Por otro lado, proponemos que los niveles incrementados de LTC4 en los pacientes con EII podrían usarse como marcadores de inflamación de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Malik TA. Inflammatory Bowel Disease: Historical Perspective, Epidemiology, and Risk Factors. Surg Clin North Am. 2015;95(6):1105-22.
2. Burisch J, Munkholm P. Inflammatory bowel disease epidemiology. Curr Opin Gastroenterol. 2013;29(4):357-62.
3. Becker C, Neurath MF, Wirtz S. The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. ILAR J. 2015;56(2):192-204.
4. Ramos GP, Papadakis KA. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. Mayo Clin Proc. 2019;94(1):155-165.
5. Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, Yoneno K, Matsuoka K, Hibi T. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Pharmacol Ther. 2013;137(3):283-97.
6. McGovern DP, Kugathasan S, Cho JH. Genetics of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology.. 2011;32(2):73-79.

7. Shaw MH, Kamada N, Warner N, Kim YG, Nuñez G. The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition,and T cell activation. Trends Immunol. 2015;149(5):1163-1176.e2.

8. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature. 2011;474(7351):307-317.

9. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2010;105(12): 2687-2692.

10. Selby W, Pavli P, Crotty B, et al; Antibiotics in Crohn's Disease Study Group. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. Gastroenterology. 2007;132(7):2313-2319.

11. Olszak T, An D, Zeissig S, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function.Science. 2012;336(6080):489-493.

12. Khalili H, Higuchi LM, Ananthakrishnan AN, et al. Oral contraceptives, reproductive factors and risk of inflammatory bowel disease. Gut. 2013;62(8):1153-1159.

13. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. Ann Intern Med. 2012;156(5):350-359.

14. Kvasnovsky CL, Aujla U, Bjarnason I. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and exacerbations of inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol. 2015;50(3):255-263.

15. Chu KM, Watermeyer G, Shelly L, et al. Childhood helminth exposure is protective against inflammatory bowel disease: a case control study in South Africa. Inflamm Bowel Dis. 2013; 19(3):614-620.

16. Cholapranee A, Ananthakrishnan AN. Environmental hygiene and risk of inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. Inflamm Bowel Dis. 2016;22(9):2191-2199.

17. Orel R, Kamhi Trop T. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2014;20(33):11505-24.

18. Jacobs MC, Haak BW, Hugenholtz F, Wiersinga WJ. Gut microbiota and host defense in critical illness. Curr Opin Crit Care. 2017;23(4):257-263.

19. Kåhrström CT, Pariente N, Weiss U. Intestinal microbiota in health and disease. Nature. 2016;535(7610):47.

20. Koboziev I, Reinoso Webb C, Furr KL, Grisham MB. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. Free Radic Biol Med. 2014;68:122-33.

21. Dicks LMT, Geldenhuys J, Mikkelsen LS, Brandsborg E, Marcotte H. Our gut microbiota: a long walk to homeostasis. Benef Microbes. 2018;9(1):3-20.

22. Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, MacDonald TT, Troost F, Cani PD, Theodorou V, Dekker J, Méheust A, de Vos WM, Mercenier A, Nauta A, Garcia-Rodenas CL. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers.Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2017;312(3):G171-G193.

23. Grill JI, Neumann J, Hiltwein F, Kolligs FT, Schneider MR. Intestinal E-cadherin Deficiency Aggravates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis.Dig Dis Sci. 015;60(4):895-902.

24. Zbar AP, Simopoulos C, Karayiannakis AJ. Cadherins: an integral role in inflammatory bowel disease and mucosal restitution. J Gastroenterol. 2004;39(5):413-21.

25. Shaoul R, Okada Y, Cutz E, Marcon MA. Colonic expression of MUC2, MUC5AC, and TFF1 in inflammatory bowel disease in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2004;38(5):488-93.

26. Hanski C, Born M, Foss HD, Marowski B, Mansmann U, Arastéh K, Bachler B,Papenfuss M, Niedobitek F. Defective post-transcriptional processing of MUC2 mucin in ulcerative colitis and in Crohn's disease increases detectability of the MUC2 protein core. J Pathol. 1999;188(3):304-11.

27. Herfarth HH, Kappelman MD, Long MD, Isaacs KL. Use of Methotrexate in the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. Inflamm Bowel Dis. 2016;22(1):224-33.

28. Coskun M, Steenholdt C, de Boer NK, Nielsen OH. Pharmacology and Optimization of Thiopurines and Methotrexate in Inflammatory Bowel Disease. Clin Pharmacokinet. 2016;55(3):257-74.

29. Chan HC, Ng SC. Emerging biologics in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol. 2017;52(2):141-150.

30. Pouillon L, Bossuyt P, Vanderstukken J, Moulin D, Netter P, Danese S, Jouzeau JY, Loeuille D, Peyrin-Biroulet L. Management of patients with inflammatory bowel disease and spondyloarthritis. Expert Rev Clin Pharmacol. 2017;10(12):1363-1374.

31. Bonovas S, Fiorino G, Lytras T, Nikolopoulos G, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Systematic review with meta-analysis: use of 5-aminosalicylates and risk of colorectal neoplasia in patients with inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2017;45(9):1179-1192.

32. Simon H, Fischer T, Almási A, Fischer E. Effects of Mesalazine on Morphological and Functional Changes in the Indomethacin-Induced Inflammatory Bowel Disease (Rat Model of Crohn's Disease).Pathol Oncol Res. 2017;23(1):41-46.

33. Celiberto LS, Graef FA, Healey GR, Bosman ES, Jacobson K, Sly LM, Vallance BA. Inflammatory bowel disease and immunonutrition: novel therapeutic approaches through modulation of diet and the gut microbiome. Immunology. 2018;155(1):36-52.

34. Theron AJ, Steel HC, Tintinger GR, Gravett CM, Anderson R, Feldman C. Cysteinyl Leukotriene Receptor-1 Antagonists as Modulators of Innate Immune Cell Function. J Immunol Res. 2014;2014:1–16.

35. Kanaoka Y, Boyce JA. Cysteinyl leukotrienes and their receptors; emerging concepts. Allergy Asthma Immunol Res. Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology and Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease; 2014 Jul;6(4):288–95.

36. Liu M, Yokomizo T. The role of leukotrienes in allergic diseases. Allergol Int. 2015;64(1):17–26.

37. Lam BK, Penrose JF, Freeman GJ, Austen KF. Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C4 synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A4. Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences; 1994 Aug 2;91(16):7663–7.

38. Reid GK, Kargman S, Vickers PJ, Mancini JA, Léveillé C, Ethier D, et al. Correlation Between Expression of 5-Lipoxygenase-Activating Protein, 5-Lipoxygenase, and Cellular Leukotriene Synthesis. J Biol Chem. 1990;265(32):19818–23.

39. Savari S, Vinnakota K, Zhang Y, Sjölander A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: bridging inflammation and colorectal cancer. World J Gastroenterol. Baishideng Publishing Group Inc; 2014 Jan 28;20(4):968–77.

40. Sharma JN, Mohammed LA. The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: Is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets? Inflammopharmacology. 2006 Mar;14(1–2):10–6.

41. Singh RK, Gupta S, Dastidar S, Ray A. Cysteinyl Leukotrienes and Their Receptors: Molecular and Functional Characteristics. Pharmacology. 2010;85(6):336–49.

42. Di Capite J, Nelson C, Bates G, Parekh AB. Targeting Ca2+ release–activated Ca2+ channel channels and leukotriene receptors provides a novel combination strategy for treating nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol. 2009 Nov;124(5):1014–1021.e3.

43. Ferrer R, Moreno JJ. Role of eicosanoids on intestinal epithelial homeostasis. Biochem Pharmacol. 2010 Aug 15;80(4):431–8.

44. Morteau O, Morham SG, Sellon R, Dieleman LA, Langenbach R, Smithies O, Sartor RB. Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2.J Clin Invest. 2000 Feb;105(4):469-78.

45. Holtzman MJ, Zhang V, Hussain H, Roswit WT, Wilson JD. Prostaglandin H synthase and lipoxygenase gene families in the epithelial cell barrier. Ann N Y Acad Sci. 1994 Nov 15;744:58–77.

46. Masoodi M, Pearl DS, Eiden M, Shute JK, Brown JF, Calder PC, et al. Altered Colonic Mucosal Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) Derived Lipid Mediators in Ulcerative Colitis: New Insight into Relationship with Disease Activity and Pathophysiology. Nakano H, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2013 Oct 18;8(10):e76532.

47. de Oliveira SRP, Nomizo A, Frantz FG, Faccioli LH, de Matos APK, Carrilho E, et al. Participation of Leukotrienes in the Immune Modulation of Oral Tolerance. Front Microbiol. Frontiers Media SA; 2017;8:242.

48. Paruchuri S, Mezhybovska M, Juhas M, Sjölander A. Endogenous production of leukotriene D4 mediates autocrine survival and proliferation via CysLT1 receptor signalling in intestinal epithelial cells. Oncogene. 2006 Oct 26;25(50):6660–5.

49. Wu X, Biswal SS, Kehrer JP. Roles of 5-lipoxygenase activating protein in cell proliferation and apoptosis. Cell Biol Toxicol. 2003 Jun;19(3):135–43.

50. Massoumi R, Nielsen CK, Azemovic D, Sjölander A. Leukotriene D4-induced adhesion of Caco-2 cells is mediated by prostaglandin E2 and upregulation of alpha2beta1-integrin. Exp Cell Res. 2003 Oct 1;289(2):342–51.

51. Rodríguez-Lagunas MJ, Storniolo CE, Ferrer R, Moreno JJ. 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid and leukotriene D4 increase intestinal epithelial paracellular permeability. Int J Biochem Cell Biol. 2013 Jul;45(7):1318–26.

52. Parhamifar L, Sime W, Yudina Y, Vilhardt F, Mörgelin M, Sjölander A. Ligand-Induced Tyrosine Phosphorylation of Cysteinyl Leukotriene Receptor 1 Triggers Internalization and Signaling in Intestinal Epithelial Cells. Linden R, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2010 Dec 28;5(12):e14439.

53. Nakamori Y, Komatsu Y, Kotani T, Kojima S, Takeuchi K. Pathogenic Importance of Cysteinyl Leukotrienes in Development of Gastric Lesions Induced by Ischemia/Reperfusion in Mice. J Pharmacol Exp Ther. 2010 Apr 1;333(1):91–8.

54. Barajas-Espinosa A, Ochoa-Cortes F, Moos MP, Daniel Ramirez F, Vanner SJ, Funk CD. Characterization of the Cysteinyl Leukotriene 2 Receptor in Novel Expression Sites of the Gastrointestinal Tract. Am J Pathol. 2011 Jun;178(6):2682–9.

55. Cabrera G, Fernández-Brando RJ, Mejías MP, Ramos MV, Abrey-Recalde MJ, Vanzulli S, et al. Leukotriene C4 increases the susceptibility of adult mice to Shiga toxin-producing Escherichia coli infection. Int J Med Microbiol. 2015 Dec;305(8):910–7.

56. Boeckxstaens G. Mast cells and inflammatory bowel disease. Curr Opin Pharmacol.2015 Dec;25:45-9.

57. Conti P, Caraffa A, Ronconi G, Kritas SK, Mastrangelo F, Tettamanti L, Theoharides TC. Impact of mast cells in mucosal immunity of intestinal inflammation: Inhibitory effect of IL-37. Eur J Pharmacol. 2018 Jan 5;818:294-299.

58. He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2004 Feb 1;10(3):309-18.

59. Casellas F, Guarner F, Antolín M, Rodríguez R, Salas A, Malagelada JR. Abnormal leukotriene C4 released by unaffected jejunal mucosa in patients with inactive Crohn's disease. Gut. 1994 Apr;35(4):517-22.

60. Blokzijl H, van Steenpaal A, Vander Borght S, Bok LI, Libbrecht L, Tamminga M, Geuken M, Roskams TA, Dijkstra G, Moshage H, Jansen PL, Faber KN. Up-regulation and cytoprotective role of epithelial multidrug resistance-associated protein 1 in inflammatory bowel disease.J Biol Chem. 2008 Dec 19;283(51):35630-7.

61. Andrade MC, Menezes JS, Cassali GD, Martins-Filho OA, Cara DC, Faria AMC. alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. Clin Exp Immunol. 2006 Nov;146(2):312–22.

62. Alvarez C, Amaral MM, Langellotti C, Vermeulen M. Leukotriene C4 prevents the complete maturation of murine dendritic cells and modifies interleukin-12/interleukin-23 balance. Immunology. 2011 Oct;134(2):185–97.

63. Iliev ID, Spadoni I, Mileti E, Matteoli G, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. Gut. 2009 Nov 1;58(11):1481–9.

64. Gupta SK, Peters-Golden M, Fitzgerald JF, Croffie JM, Pfefferkorn MD, Molleston JP, et al. Cysteinyl Leukotriene Levels in Esophageal Mucosal Biopsies of Children with Eosinophilic Inflammation: Are They All the Same? Am J Gastroenterol. 2006;101:1125–8.

65. Frossard CP, Asigbetse KE, Burger D, Eigenmann PA. Gut T cell receptor-γδ $^{+}$ intraepithelial lymphocytes are activated selectively by cholera toxin to break oral tolerance in mice. Clin Exp Immunol. 2015 Apr;180(1):118–30.

66. Stelmach I, Korzeniewska A, Stelmach W, Majak P, Grzelewski T, Jerzynska J. Effects of montelukast treatment on clinical and inflammatory variables in patients with cystic fibrosis. Ann Allergy Asthma Immunol. 2005; 95:372-80.

67. Ahmed A, Holton J, Vaira D, Smith SK, Hoult JR. Eicosanoid synthesis and Helicobacter pylori associated gastritis: increase in leukotriene C4 generation associated with H. pylori colonization. Prostaglandins. 1992; 44:75-86.

68. Capra V, Thompson MD, Sala A, Cole DE, Folco G, Rovati GE: Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. Med Res Rev 2007; 27: 469–527.

69. Bandeira-Melo C, Weller PF. Eosinophils and cysteinyl leukotrienes. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2003; 69:135-43.

70. Hui Y, Cheng Y, Smalera I, Jian W, Goldhahn L, Fitzgerald GA, et al. Directed vascularexpression of human cysteinyl leukotriene 2 receptor modulates endothelial permeability and systemic blood pressure. Circulation. 2004 Nov 23;110(21):3360–6.

71. Badr KF, Baylis C, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Soberman RJ, Lewis RA, et al. Renal and systemic hemodynamic responses to intravenous infusion of leukotriene C4 in the rat. Circ Res. 1984 May;54(5):492–9.

72. Landgraf RG, Nossi DF, Sirois P, Jancar S. Prostaglandins, leukotrienes and PAF selectively modulate lymphocyte subset and eosinophil infiltration into the airways in a murine model of asthma. Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids. 2007 Oct;77(3–4):163–72.

73. Hosoki K, Kainuma K, Toda M, Harada E, Chelakkot-Govindalayathila A-L, Roeen Z, et al. Montelukast suppresses epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells induced by eosinophils. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Jul 4;449(3):351–6.

74. Qiu Y, Yu M, Yang Y, Sheng H, Wang W, Sun L, et al. Disturbance of intraepithelial lymphocytes in a murine model of acute intestinal ischemia/reperfusion. J Mol Histol. Springer Netherlands; 2014 Apr 12;45(2):217–27.

75. Qiu Y, Yang H. Effects of Intraepithelial Lymphocyte-Derived Cytokines on Intestinal Mucosal Barrier Function. J Interf Cytokine Res. 2013 Oct;33(10):551–62.

76. Jeon MK, Klaus C, Kaemmerer E, Gassler N. Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers. World J Gastrointest Pathophysiol. 2013 Nov 15;4(4):94.

77. Orlando A, Linsalata M, Notarnicola M, Tutino V, Russo F. Lactobacillus GG restoration of the gliadin induced epithelial barrier disruption: the role of cellular polyamines. BMC Microbiol. 2014 Jan 31;14(1):19.

78. Schumann M, Kamel S, Pahlitzsch M-L, Lebenheim L, May C, Krauss M, et al. Defective tight junctions in refractory celiac disease. Ann N Y Acad Sci. 2012 Jul;1258(1):43–51.

79. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. Immunol Rev. NIH Public Access; 2011 May;241(1):241–59.

80. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. Autoimmun Rev. 2014 Jan;13(1):3–10.

81. Rescigno M. Dendritic cell-epithelial cell crosstalk in the gut. Immunol Rev. 2014 Jul;260(1):118–28.

82. Branski D, Hurvitz H, Halevi A, Klar A, Navon P, Weidenfeld J. Eicosanoids content in small intestinal mucosa of children with celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1992 Feb;14(2):173–6.

83. Vorobjova T, Uibo O, Heilman K, Uibo R. Increased density of tolerogenic dendritic cells in the small bowel mucosa ofceliac patients. World J Gastroenterol. 2015 Jan 14;21(2):439-52.

84. Maddaloni M, Kochetkova I, Jun S, Callis G, Thornburg T, Pascual DW. Milk-Based Nutraceutical for Treating Autoimmune Arthritis via the Stimulation of IL-10- and TGF-β-producing CD39+ Regulatory T Cells. Fang D, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2015 Jan 28;10(1):e0117825.

85. Arrieta M-C, Madsen KL, Field CJ, Meddings JB. Increasing Small Intestinal Permeability Worsens Colitis in the IL-10−/− Mouse and Prevents the Induction of Oral Tolerance to Ovalbumin. Inflamm Bowel Dis. 2015 Jan;21(1):8–18.

86. Wang L, Du C, Lv J, Wei W, Cui Y, Xie X. Antiasthmatic Drugs Targeting the Cysteinyl Leukotriene Receptor 1 Alleviate Central Nervous System Inflammatory Cell Infiltration and Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Immunol. 2011 Sep 1;187(5):2336–45.

87. Lee W, Su Kim H, Lee GR. Leukotrienes induce the migration of Th17 cells. Immunol Cell Biol. 2015 May 16;93(5):472–9.

88. Harizi H, Gualde N. The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells. Tissue Antigens. 2005 Jun;65(6):507–14.

89. Baek MS, Mok YM, Han W-C, Kim YS. A Patient with Eosinophilic Gastroenteritis Presenting with Acute Pancreatitis and Ascites. Gut Liver. 2014 Mar 15;8(2):224–7.

90. Selvi E, Rubegni P, Manganelli S, De Stefano R, Frati E, Lorenzini S, et al.

Combination Therapy With Montelukast and Ketotifen for Arthritis and Rash Resulting From Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome. JCR J Clin Rheumatol. 2004 Dec;10(6):344–6.

91. Drakatos P(1), Lykouras D, Sampsonas F, Karkoulias K, Spiropoulos K. Targeting leukotrienes for the treatment of COPD? Inflamm Allergy Drug Targets. 2009 Sep;8(4):297-306.

92. Gottlieb Y, Elhasid R, Berger-Achituv S, Brazowski E, Yerushalmy-Feler A, Cohen S. Neutrophil extracellular traps in pediatric inflammatory bowel disease. Pathol Int. 2018 Sep;68(9):517-523.

93. Segal AW.The role of neutrophils in the pathogenesis of Crohn's disease. Eur J Clin Invest. 2018 Nov;48 Suppl 2:e12983.

94. Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., et al. (1997). Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91, 385–395. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80422-5.

95. Williams, C., Panaccione, R., Ghosh, S., Rioux, K., 2011. Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. Therap. Adv..

96. Gastroenterol. 4, 237–248.

97. Shahdadi Sardo H, Saremnejad F, Bagheri S, Akhgari A, AfrasiabiGarekani H, Sadeghi F. A review on 5-aminosalicylic acid colon-targeted oral drug delivery systems. Int J Pharm. 2019 Mar 10;558:367-379.

98. Williams C, Panaccione R, Ghosh S, Rioux K. Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. Therap. Adv. Gastroenterol. 2011 Jul;4(4):237-48.

99. Munkholm P, Michetti P, Probert CS, Elkjaer M, Marteau P.Best practice in the management of mild-to-moderately active ulcerative colitis and achieving maintenance of remission using mesalazine. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2010 Aug;22(8):912-6.

100. Abdu-allah, H.H., Abdel-Moty, S.G., El-awady, R., Abdu Allah, H.H., El Shorbagi, A.A.N., Abdel-Moty, S.G., El-awady, R., Abdel-Alim, A.A.M., 2016. 5-Aminosalyclic acid (5-ASA): a unique anti-inflammatory salicylate. Med. Chem. (Los. Angeles) 06, 306–315.

101. Di Mario, F., Comparato, G., Fanigliulo, L., Aragona, G., Cavallaro, L.G., Cavestro, G.M., Franze, A., 2006. Use of mesalazine in diverticular disease. J. Clin. Gastroenterol. 40, 155–159.

102. Joshi, R., Kumar, S., Unnikrishnan, M., Mukherjee, T., 2005. Free radical scavenging reactions of sulfasalazine, 5-aminosalicylic acid and sulfapyridine: mechanistic aspects and antioxidant activity. Free Radic. Res. 39, 1163–1172.

103. Giaffer MH, Holdsworth CD, Lennard-Jones JE, Rodrigues CA, McIntyre PB, Manjunatha S, Baron JH, Barrison IG, Polson RJ, Hoare AM, et al. Improved maintenance of remission in ulcerative colitis by balsalazide 4 g/day compared with 2 g/day. Aliment Pharmacol Ther. 1992 Aug;6(4):479-85.

104. What is the Real-Life Maintenance Mesalazine Dose in Ulcerative Colitis? Revista Española de Enfermedades Digestivas 2017Feb;109(2):114-121.

105. Neprasova M, Maixnerova D, Novak J, Reily C, Julian BA, Boron J, Novotny P, Suchanek M, Tesar V, Kacer P. Toward Noninvasive Diagnosis of IgA Nephropathy: A Pilot Urinary Metabolomic and Proteomic Study. Dis Markers. 2016;2016:3650909.

106. Vasanth P(1), Parmley M(2), Torrealba J(2), Hamdi T(1). Interstitial Nephritis in a Patient with Inflammatory Bowel Disease. Case Rep Nephrol. 2016;2016:4260365. Epub 2016 Sep 14.

107. Co ML(1), Gorospe EC. Pediatric case of mesalazine-induced interstitial nephritis with literature review. Pediatr Int. 2013 Jun;55(3):385-7. doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03745.x.

108. World MJ(1), Stevens PE, Ashton MA, Rainford DJ. Mesalazine-associated interstitial nephritis. Nephrol Dial Transplant. 1996;11(4):614-21.

109. Santoro T, Morris D, Murphy R, Baker R. Aberrant production of leukotriene C4 by macrophages from autoimmune-prone mice. J Exp Med 1988; 168: 783-88.

110. Greuter T, Vavricka S. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease -epidemiology, genetics and pathogenesis, *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology,* 2019; 13(4):307-317.

111. Sayeh Savari, Katyayni Vinnakota, Yuan Zhang, Anita Sjölander. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: Bridging inflammation and colorectal cancer. World J Gastroenterol 2014; 20(4): 968-977.

ABSTRACT

Leukotriene C4 (LTC4) is a potent pro-inflammatory lipid mediator and a known immunomodulatory agent of allergic reactions that affect the mucosa. We and other groups demonstrated that LTC4 modulates the function of dendritic cells (DC), inducing their chemotaxis and activation. Here, we studied the ability of LTC4 to alter normal intestinal homeostasis, triggering mucosal inflammatory processes. Firstly, we found that in DCs stimulated with LTC4 and co-cultured with enterocytes, the percentages of the CD103+ marker characteristic of tolerogenic DCs were downregulated, and in these co-cultures the secretion of the pro-inflammatory cytokine TNF-α was induced. All of these phenomena could interfere with normal mucosal homeostasis. Then, in a murine model of oral tolerance to ovalbumin we corroborated in vivo that LTC4 affects normal epithelial morphology in addition to inducing the recruitment of eosinophilic granulocytes. It is also capable of modifying the normal balance of IL-10/TGF-β in the mesenteric lymph nodes. Strikingly, the LTC4 type 1 receptor antagonist montelukast reduced neutrophil recruitment but failed to reverse the changes in intestinal morphology caused by LTC4. Because a high concentration of leukotrienes and/or their receptors has been demonstrated in chronic inflammatory diseases that affect the digestive tract, we decided to study the possible association between LTC4 and inflammatory response in colonic biopsies from patients with inflammatory bowel disease (IBD). We found that IBD patients presented exacerbated levels of IL-8 and a large number of neutrophils in the mucosa compared to normal biopsies, which positively correlated with the levels of LTC4 that are exacerbated in these patients. Strikingly, these observations were more important in IBD patients who had developed extraintestinal manifestations. Altogether, these results not only indicate a strong association between LTC4 and the development

of the inflammatory response in patients with IBD, but could in the future allow redesigning the therapies currently used for the management of these patients.

SELECCIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS PARA ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA EN POBLACIÓN ARGENTINA. CONSTRUCCIÓN DE PERFILES DE RIESGO CON UTILIDAD DIAGNÓSTICA

Federico Aranda, Silvia Perés Wingeyer, Cristina Duboscq, José Ceresetto, Patricia Casais, Gabriela de Larrañaga

Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz. Hospital Británico de Buenos Aires. Academia Nacional de Medicina - Instituto de Investigaciones Epidemiológicas

INTRODUCCIÓN

La hemostasia abarca un conjunto de mecanismos complejos y finamente regulados, entre los cuales están incluidos los procesos de coagulación de la sangre, activación de las plaquetas y reparación de la vasculatura. Diferentes estímulos, tales como alteraciones en el endotelio que recubre las paredes internas de los vasos sanguíneos o respuestas inmunológicas frente a distintos patógenos pueden ser los responsables de activar, en primera instancia, los mecanismos de coagulación y de activación de plaquetas. Éstos, a su vez, son capaces de retroalimentarse y acelerarse el uno al otro con el objetivo final de formar un coágulo sanguíneo.[1] Por este motivo, es fundamental que dichos mecanismos estén perfectamente regulados.

En distintas situaciones, los procesos de coagulación y activación plaquetaria pueden estar exacerbados, puede haber fallas en su regulación o haber alteraciones en los mecanismos de remoción del coágulo, desencadenando la formación de un trombo. Por definición, un trombo es un coágulo, constituido principalmente por plaquetas agregadas y una red de moléculas de fibrina, que provoca la obstrucción de un vaso sanguíneo, y cuya formación depende de alteraciones en tres factores: el fluido sanguíneo, el estado del endotelio vascular y la composición de la sangre.[2]

La formación de un trombo en alguna de las venas profundas del organismo, que reduce el flujo sanguíneo es una patología denominada Trombosis Venosa Profunda (TVP) y puede causar el infarto de los tejidos abastecidos por dicho vaso. El desenlace más severo que puede tener una trombosis es su embolización en el pulmón. Esta complicación es conocida como Trombo-Embolismo Pulmonar (TEP) y aproximadamente el 20% de los pacientes que sufren TEP mueren antes de ser diagnosticados o durante el primer día.[3] Para agrupar colectivamente a la TVP, al TEP y a las trombosis en sitios inusuales, se utiliza el término Enfermedad Tromboembólica Venosa (ETV) aguda, siendo la patología vascular más frecuente luego de las enfermedades de las arterias coronarias y las cerebrovasculares.[4]

Cada año aproximadamente 1/1000 personas desarrolla ETV. Entre 1% y 2% de estos pacientes muere a causa de TEP y alrededor del 25% sufre de los efectos crónicos del síndrome post-trombótico.[4,5] En Argentina, se estima que unas 60.000 personas sufren

ETV por año y, de ellas, aproximadamente unas 15.000 personas desarrollan TEP. Teniendo en cuenta que la tasa de mortalidad del TEP es de hasta 30%, esto se traduce en alrededor de 4.000 muertes por año en el país.

La ETV es una patología multifactorial y está asociada a distintos factores de riesgo, como edad avanzada, cirugía, trauma, uso de catéter venoso, reposo prolongado en cama, viaje de larga distancia en avión, tumores malignos, quimioterapia, embarazo, puerperio, uso de anticonceptivos orales, terapia hormonal de reemplazo, obesidad, infecciones, enfermedades inflamatorias, tabaquismo, y factores genéticos.[2,6-8] A su vez, cada factor de riesgo está asociado a uno o más mecanismos de acción involucrados en la formación del trombo, como daño vascular, estasis, efectos de la inmunidad innata, hipoxia, daño endotelial, liberación de micropartículas circulantes procoagulantes, alteración de la concentración y/o funcionamiento de los factores de coagulación, de las proteínas anticoagulantes y/o de las involucradas en la fibrinólisis.[1,2,9,10]

La tendencia a desarrollar ETV sobre la base de un estado de hipercoagulabilidad, debido a las alteraciones heredadas o adquiridas en los procesos de coagulación o fibrinólisis, se denomina trombofilia. La trombofilia hereditaria, es decir aquélla que tiene un origen genético, es causada principalmente mediante dos mecanismos: pérdida de función de los anticoagulantes naturales (incluyendo deficiencias o disfunciones de antitrombina (AT), proteína C o proteína S) o ganancia de función de factores procoagulantes.

En el contexto de la ETV, los ensayos de detección genéticos actualmente más usados incluyen la búsqueda de la posible portación de las mutaciones Factor V Leiden (FVL) y Factor II 20210A (FII20210A) y, de manera indirecta, mediante el estudio de sus deficiencias, de mutaciones en los genes de AT, proteína C y proteína S. La lista de factores genéticos a ser evaluados en la práctica clínica no ha cambiado desde 1996.

El FVL es una mutación puntual (G1691A) en el exón 10 del gen que codifica al factor V, genera resistencia a la degradación por acción de la Proteína C activada y trae como consecuencia que la concentración de Factor V activado en plasma sea mayor de lo normal.[11] Esta mutación tiene un efecto dominante y el riesgo de desarrollar ETV para portadores heterocigotas y homocigotas del FVL es cinco y ochenta veces mayor, respectivamente, que para no portadores.[12-14] Por su parte, la FII20210A es una transición nucleotídica (G20210A) en la región 3' no traducida del gen de la protrombina, que está asociada con un incremento en los niveles plasmáticos de esta enzima y, consecuentemente, con un aumento de 3-4 veces en el riesgo de desarrollar ETV.[12,15]

Durante los últimos años se han realizado diversos estudios a nivel genómico con el objetivo de poder identificar nuevas variantes genéticas que estén implicadas en el aumento del riesgo a sufrir ETV. Los resultados obtenidos en distintos *"Genome Wide Association Studies"* sugirieron que habría también otras variantes genéticas que aportarían un efecto, aunque modesto, en el riesgo a desarrollar ETV.[16-20] De todas maneras, estos hallazgos pueden proveer información preliminar acerca del rol de estas variantes genéticas que son comunes en la población general y también pueden servir como punto de partida para analizar su influencia tanto en diferentes grupos étnicos como en distintos subgrupos de riesgo. Entre estos marcadores genéticos se destacan las variantes C10034T del gen del Fibrinógeno Gamma (FGG), C7872T del gen del Factor XI (FXI) y el grupo sanguíneo ABO.

La variante alélica T del FGG10034 ha sido asociada con un incremento de casi dos veces en el riesgo de desarrollar ETV para portadores homocigotas de la misma.[21] Mediante mecanismos de regulación post-transcripcionales, el alelo T favorece la formación de la cadena □A del fibrinógeno gamma en detrimento de la formación de la cadena □′. Esta

variante □´ posee un sitio de unión a trombina, que actúa como inhibidor de la misma, por lo que al disminuir los niveles de la cadena □´ habría un exceso de trombina circulante o también de fibrina.[21,22] La asociación entre esta variante genética y el riesgo de desarrollar ETV fue confirmada en otros estudios a gran escala.[16,17] Por otro lado, se ha reportado que altos niveles plasmáticos del Factor XI están asociados con un riesgo elevado de ETV y también han sido identificados varios polimorfismos en el gen que codifica este factor que estarían asociados con un mayor riesgo de ETV a través de la modulación de sus niveles plasmáticos, siendo el alelo FXI 7872 C el que mostró la asociación más fuerte (OR=1,35).[16,23,24] Mientras tanto, el grupo sanguíneo ABO contribuiría al riesgo a desarrollar ETV a través de la modificación de los niveles plasmáticos del Factor de von Willebrand (FvW) y del FVIII, probablemente, al afectar la glicosilación del FvW, su consecuente proteólisis por acción de la proteasa ADAMTS 13 y su posterior eliminación.[25] Los niveles del FvW y del FVIII son aproximadamente un 25% mayores en individuos cuyo grupo sanguíneo es A, B o AB respecto de aquéllos que poseen el grupo sanguíneo O y diferentes estudios mostraron que poseer un grupo sanguíneo de tipo "no O" estaría asociado a un riesgo relativo dos veces mayor de desarrollar ETV.[16,26] Además, los antígenos ABO son expresados también por células endoteliales, plaquetas y superficies epiteliales, y el tipo de grupo sanguíneo también ha mostrado asociación con los niveles plasmáticos de las moléculas de adhesión P-selectina, E-selectina y la molécula de adhesión intercelular soluble-1, lo cual podría explicar que existen otros mecanismos que involucran al grupo sanguíneo ABO en la fisiopatología de la ETV.[25,27]

La ETV se encuentra asociada tanto a procesos infecciosos como a procesos inflamatorios. Uno de los principales componentes celulares involucrados en estos procesos son los neutrófilos, los cuales suelen ser muy abundantes en los trombos. Sin embargo, aún no se encuentra claramente definido su rol en el proceso trombótico.[28]

Recientemente, se ha demostrado que los neutrófilos, además de utilizar los mecanismos de defensa clásicos, como los son la fagocitosis y la degranulación, pueden matar patógenos de una manera extracelular. Este mecanismo consiste en la liberación de estructuras en forma de redes, compuestas por ADN y proteínas con actividad antimicrobiana (como histonas, mieloperoxidasa y elastasa) denominadas NETs (del inglés *neutrophil extracellular traps*) que pegan, desarman y matan patógenos fuera de la célula.[29] Más allá de su rol clave en la defensa, las NETs tienen ciertos efectos deletéreos sobre el huésped ya que atrapan microorganismos a expensas de injuriar el endotelio y los tejidos.[30] Las NETs representarían el nexo entre inflamación y trombosis, proveyendo la plataforma y el estímulo para que las plaquetas se adhieran y se agreguen, con las histonas como principales responsables de la inducción de la agregación plaquetaria y, a su vez, pegando proteínas importantes para la estabilidad del trombo como FvW y fibrinógeno, probablemente por la afinidad de éstas con las histonas y el ADN.[31-33] Más aún, las NETs estimulan la formación y el depósito de fibrina, los mecanismos extrínsecos e intrínsecos de la cascada de coagulación, posiblemente a través de la acción del ADN e histonas, y, a su vez, las histonas inhiben mecanismos anticoagulantes en plasma, como Proteína C y trombomodulina y los ácidos nucleicos estimulan a las serinoproteasas del sistema de coagulación.[34] Confirmando la evidencia obtenida en ensayos *ex vivo*, se observó que las NETs y sus componentes se encuentran presentes en modelos animales de ETV y estarían asociadas a la maduración del trombo, al interaccionar íntimamente con las redes de fibrina.[31,35,36]

En definitiva, las NETs aparecen como parte de la respuesta inflamatoria y la organización del desarrollo del trombo. Factores de riego para ETV, entre los cuales están

incluidos trauma, cirugía, infección, inmovilización e hipoxia, son factores que están asociados de alguna manera a la formación de NETs. Sin embargo, el hallazgo de la relación entre la formación de NETs y trombosis es un hecho relativamente reciente, por lo que aún no se ha explorado profundamente la posible asociación de variantes de genes involucrados en los mecanismos de formación y/o remoción de las NETs con una mayor tendencia trombótica. Los principales genes candidatos son los que codifican para las enzimas Peptidil-arginina deaminasa 4 (PADI-4) y ADNasa-1 humana.

Un paso clave para la formación de las NETs es la decondensación de la cromatina, que se logra por la citrulinación de las histonas mediante la acción de la enzima PADI-4.[37] Existen diferentes variantes descriptas de este gen, pero hay cinco de ellas (89*G/A, 90*T/C, 92*G/C, 94*T/C, 104*T/C) que forman un haplotipo que ha sido asociado con una mayor actividad enzimática, aparentemente debido a un aumento en la estabilidad del ARN mensajero.[38] El estudio de la portación de estos distintos haplotipos sería muy relevante para evaluar la posible participación de alguno de los mismos en la fisiopatología trombótica. Por otro lado, un evento clave en el restablecimiento de los parámetros fisiológicos normales es la remoción de las NETs en circulación luego de que hubieran cumplido con su función. La principal responsable de este proceso es la enzima ADNasa-1 humana plasmática, que cliva grandes fragmentos de ADN circulantes en sangre. Se han descripto 4 variantes en el gen de la ADNasa-1 (R21S, Y95S, G105R y Q222R) que están asociadas a variaciones en la actividad de la enzima.[39] En población argentina, sólo el polimorfismo Q222R, producto del reemplazo de una adenina por una guanina en la posición +2373 del gen, tiene una prevalencia mayor al 5%.[40] El alelo G codifica una variante de la ADNasa-1 que presenta una actividad enzimática reducida, por lo que podría estar asociado a un mayor riesgo trombótico.[39]

Impacto del diagnóstico genético de trombofilia en el ámbito clínico.

Los ensayos de detección de una determinada patología permiten identificar individuos que se encuentran bajo riesgo de padecer una enfermedad evitable o de sufrir complicaciones de la misma. En la actualidad, los ensayos de detección de trombofilia tienen una utilidad limitada en el mundo. Para algunos grupos selectos de pacientes, expuestos a ciertos factores de riesgo (historia familiar de ETV, viaje prolongado, inmovilización, embarazo, puerperio, neoplasias, etc.), tener conocimiento de la portación de trombofilia hereditaria podría permitir reconocer a aquéllos que tienen un mayor riesgo trombótico y, por lo tanto, poder evitar la exposición a la situación de alto riesgo o facilitar el uso de tratamiento profiláctico específico si la situación de alto riesgo es inevitable.

La lista de factores de riesgo genéticos débiles, pero de alta prevalencia en la población general, se ha ido incrementando durante los últimos años. Pese a que cada una de estas variantes genéticas asociadas a ETV tienen un escaso valor predictivo por sí solas, su combinación podría mejorar la capacidad predictiva y ser usada en modelos de susceptibilidad a desarrollar ETV.[41] De hecho, se han realizado estudios en los que se desarrollaron "*scores*" predictores de ETV basados en el número de alelos de riesgo portados por cada individuo y considerando también otros factores además de los polimorfismos genéticos.[16,42] Además, como hemos mencionado, distintos factores ambientales juegan un rol clave en la ETV como disparadores del evento trombótico, por lo cual es muy importante tener en cuenta factores de riesgo no genéticos como cirugías, embarazo, inmovilización, lesiones en las piernas, viajes prolongados, uso de anticonceptivos orales, uso de terapia de reemplazo hormonal, obesidad y neoplasias, a la hora de desarrollar estos "*scores*" para la predicción de ETV. Los *"scores"* diseñados

considerando tanto factores genéticos como ambientales han mostrado valores predictivos muy promisorios, ya sea en población general como en familias con trombofilia hereditaria.[16,42-44]

Tal como ha sido postulado en dichos trabajos, agregar nuevas variantes genéticos predictivas en estos modelos podría mejorar la capacidad discriminativa de los mismos. Se ha visto que en este tipo de *"scores"* utilizados como predictores de riesgo, la sensibilidad y la especificidad dependen del número de variantes genéticas consideradas, de sus respectivos *odds ratios* (OR) y de las frecuencias de los alelos de riesgo.[45] La identificación de nuevos predictores genéticos, su combinación con otros tipos de factores de riesgo en el establecimiento de *"scores"* y la validación de los mismos en diferentes poblaciones de estudio podrían revelar si son una herramienta útil para la predicción de ETV, tanto en la población general como en grupos de alto riesgo expuestos a determinados factores de riesgo circunstanciales.

Hasta el momento, no existen estudios en Argentina acerca de la prevalencia de varias de las variantes genéticas mencionadas, ni tampoco acerca de su asociación con ETV. Inclusive, a nivel mundial, algunas de dichas variantes tampoco han sido analizadas como potenciales marcadores de riesgo protrombótico. Por estos motivos, el objetivo general de nuestro estudio fue analizar si diferentes variantes de genes que codifican proteínas implicadas, a distintos niveles, en los mecanismos de coagulación están asociadas a una mayor susceptibilidad a desarrollar ETV en grupos de riesgo en población argentina. En base a dichos resultados intentamos establecer, mediante el armado de "*scores*" específicos, perfiles de riesgo que incluyan factores genéticos y circunstanciales que permitan predecir mejor la susceptibilidad a sufrir ETV.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio realizado fue de tipo observacional, descriptivo, transversal, de casos y controles. El protocolo fue aprobado por los Comité de Ética en Investigación y de Docencia de los hospitales participantes y realizado de acuerdo con las normas éticas de la declaración de Helsinki 1975 y las normativas nacionales vigentes. En todos los casos, se obtuvo el consentimiento informado de cada participante antes de la inclusión en el estudio.

Para el estudio fueron reclutados 481 individuos en una relación 2:1 de controles (n=322) y pacientes con ETV (n=159).

La selección de los individuos pertenecientes al grupo de los casos fue realizada de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: individuos argentinos residentes en CABA y Gran Buenos Aires, hijos e hijas de argentinos, mayores de 18 años de edad con diagnóstico por imagen de ETV. Fueron incluidos pacientes que presentaron diferentes factores de riesgo para ETV como cáncer, enfermedades metabólicas, mujeres embarazadas y sometidos a cirugías de alto o bajo riesgo, entre otros. Aquellos individuos que se hubiesen negado a la firma del consentimiento informado, fuesen menores de 18, sufriesen de cirrosis, o pacientes que hubiesen presentado trombosis venosas superficiales o trombosis arteriales agudas fueron excluidos del estudio. Por su parte, la selección de los individuos que forman parte del grupo control fue hecha de acuerdo a los siguientes criterios: individuos argentinos, mayores de 18 años de edad, residentes en CABA y Gran Buenos Aires, hijos o hijas de argentinos, de población general no relacionada y no seleccionada.

La selección de los pacientes estuvo a cargo de médicos hematólogos del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Británico de Buenos Aires. Asimismo, los médicos tratantes fueron los encargados de la recolección de los datos clínicos y la obtención del consentimiento informado en presencia de un testigo. También en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Británico de Buenos Aires, se realizó la extracción de las muestras de sangre y se hicieron los estudios asistenciales correspondientes (rutina y trombofilia). Las muestras fueron adecuadamente codificadas, al resguardo de la confidencialidad de los pacientes. A su vez, una muestra de sangre entera con EDTA de cada paciente y de cada control fue guardada para su posterior investigación en el laboratorio de Hemostasia del Hospital Muñiz.

En el Laboratorio de Hemostasia del Hospital F. J. Muñiz fueron realizados todos los estudios de genotipificación de las distintas variantes genéticas previstos en el proyecto. Todos los datos clínicos, bioquímicos y genéticos obtenidos fueron volcados en la correspondiente base de datos.

Se registraron los siguientes datos clínicos de los pacientes con ETV: edad, sexo, peso, altura, grupo sanguíneo, tipo de paciente (internado/ambulatorio), tabaquismo, hipertensión, diabetes, dislipemia (Triglicéridos ≥150 mg/dL y/o Colesterol HDL bajo (<40 [hombres] y <50 [mujeres] mg/dL) y/o Colesterol LDL alto (≥130 mg/dL o bajo tratamiento hipolipemiante)), uso de anticonceptivos orales, tratamiento hormonal, antecedentes de viajes largos en el mes previo al evento trombótico, cirugías (indicando si fue de alto o bajo riesgo), trauma, uso de catéter, neoplasias en los seis meses previos al evento trombótico (indicando tipo y estadio de la neoplasia), embarazo, puerperio, antecedentes obstétricos (pérdidas fetales, preeclampsia, abruptio placentae, restricción del crecimiento intrauterino), enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas en el mes previo al evento trombótico, enfermedades inflamatorias intestinales, reposo (inmovilización en cama durante más de 72 horas), antecedentes trombóticos familiares y sitio de la trombosis.

A todos los pacientes con ETV se les extrajo una muestra de sangre por punción venosa después de 12 h de ayuno en tubos de plástico con: a) citrato de sodio al 3,2% (relación 9:1) y b) tubo seco con gel y c) EDTA. De las muestras con citrato de sodio se obtuvo plasma por centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos, del que se guardaron alícuotas a -80°C hasta su análisis. De manera similar, de las muestras en tubo seco en seco con gel se dejó exudar completamente el suero, el cual se separó posteriormente por centrifugación a 3500 rpm por 15 minutos y se guardaron alícuotas congeladas a -80°C. Las alícuotas utilizadas se descongelaron sólo una vez en un baño de agua a 37°C antes de su uso. La sangre recogida en tubos con EDTA fue almacenada a -20°C para ser utilizada en la extracción de ADN, que posteriormente se utilizó en las correspondientes genotipificaciones.

A partir de las muestras de plasma citratado se realizaron las siguientes determinaciones bioquímicas: Tiempo de protrombina (PT-Fibrinogen HS plus), Tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT SP), Cuantificación de Fibrinógeno por método de Clauss (Hemosilfibrinogen), Inhibidor Lúpico (según normas del sub-comité internacional de estandarización de Inhibidor Lúpico mediantes dos pruebas de screening, pruebas de corrección y pruebas confirmatorias), y determinación de los valores plasmáticos de Proteína C por sustratos cromogénicos (Hemosil Protein C), Proteína S libre por inmunoturbidimetría (Hemosil Free Protein S), Antitrombina por sustratos cromogénicos (Hemosil Antithrombin) y Factor VIII, XI y XII por método coagulable en una etapa, en tres diluciones. Todas las pruebas fueron realizadas en un Coagulómetro ACL TOP 500 con sus reactivos correspondientes (Instrumentation Laboratory, Italia).

En aquellos casos en los que los pacientes presentaron niveles de PC menor al 70%, de AT menor al 80% y/o de PS libre menor al 60%, se definió como déficit del correspondiente anticoagulante natural. Mientras tanto, utilizando las muestras de suero de los pacientes se realizaron las mediciones de Anticuerpos Anticardiolipinas IgG e IgM (ELISA, BioRad), Anticuerpos anti β_2Glicoproteína I IgG e IgM (ELISA, BioRad) y Homocisteína total por enzimoinmunoensayo (Axis).

La Extracción de ADN genómico de las muestras de todos los sujetos involucrados en el estudio fue realizada a partir de las muestras de sangre en tubos con EDTA mediante un método semi-automatizado utilizando el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Alemania). El estudio de las distintas variantes genéticas se realizó mediante las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (Real Time PCR) o de PCR-análisis del largo de los fragmentos de restricción (RFLP) o PCR-secuenciación, según correspondiese.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico SPSS versión 23.0 para Windows (IBM SPSS Statistics 23, EE.UU.). La frecuencia de las distintas variables clínicas analizadas en el grupo de pacientes con ETV se describió como porcentajes y también se indicó número total de pacientes. Las distribuciones genotípicas de cada una de las variantes en los grupos de casos y controles se describieron como porcentajes, indicándose también el número total en cada caso. Para evaluar la asociación de las variantes genéticas con la predisposición a sufrir ETV y con determinadas variables clínicas estudiadas se construyó una tabla de contingencia para poder contrastar la hipótesis de asociación mediante un test de χ^2. Los *odds ratios* (OR) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% fueron estimados por regresión logística binaria. Un valor de $p<0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

En la tabla 1 se detallan las principales características epidemiológicas y clínicas del grupo de pacientes con ETV.

Tabla 1. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con ETV.

Variable	ETV (n)
Género femenino	50,9 % (81)
Edad	63 [48-73]
Sitio de la trombosis	
✓ Miembro inferior	59,7% (95)
✓ TEP	27,0% (43)
✓ Miembro superior	3,1% (5)
✓ Sitio inusual	8,2% (13)
Cirugía	13,2 % (21)
✓ Mayor / Alto riesgo	6,3 % (10)
✓ Menor / Bajo riesgo	6,9 % (11)
Trauma	3,4 % (5)
Reposo por cirugía o trauma	18,3% (29)
Neoplasia	15,7 % (27)
✓ Colon / Recto	3,1 % (5)
✓ Mama	1,3 % (2)
✓ Próstata	0,6 % (1)
✓ Páncreas	1,9 % (3)
✓ Pulmón	3,1 % (5)
✓ Riñón	1,3 % (2)
✓ Linfoma no Hodgkin	1,3 % (2)
✓ Otros	3,1 % (5)
Embarazo	0,6 % (1)
Puerperio	0,6 % (1)
Uso de catéter	1,9 % (3)
Enfermedad autoinmune	0,6 % (1)

Los datos están expresados como porcentajes (n total) o medianas [rango intercuartiles].

Considerando sus características clínicas, los pacientes fueron clasificados en tres grupos de acuerdo a si presentaron alguna comorbilidad que fuese, por sí misma, un factor de riesgo asociado a ETV. De esta manera, un 61,6% (98) presentó ETV espontánea, un 19,5% (31) ETV secundaria a un factor de alto riesgo y el 18,9% restante (30) ETV secundaria a un factor de bajo riesgo.

El grupo control estuvo compuesto por 322 individuos, de los cuales el 48,7 % (157) fueron mujeres mientras que el 51,3 % (165) fueron hombres. La mediana de edad en este grupo fue de 42 [32-48] años. La distribución por sexo fue comparable entre ambos grupos (p=0,841) mientras que la mediana de edad de los pacientes con ETV resultó ser significativamente mayor que la de los controles (p<0,05).

En la tabla 2 se detallan las distribuciones genotípicas de todas las variantes genéticas estudiadas en el grupo de pacientes con ETV comparadas con las frecuencias obtenidas en el grupo control.

Tabla 2. Distribución genotípica de las variantes genéticas en ETV con relación al grupo control.

Variante genética	ETV (n =159)	Control (n=322)	*p*
FVL			
G/G	85,5 % (136)	97,8 % (142)	
G/A	13,8 % (22)	2,2 % (4)	0,001
A/A	0,6% (1)		
FII 20210A			
G/G	91,2 % (145)	96,0 % (309)	
G/A	8,8 % (14)	4,0 % (13)	0,033
FGG 10034C/T			
C/C	57,2 % (91)	65,2 % (210)	
C/T	35,2 % (56)	30,1 % (97)	0,171
T/T	7,6 % (12)	4,7 % (15)	
FXI 7872C/T			
C/C	30,2 % (48)	27,3 % (88)	
C/T	54,1 % (86)	53,4 % (172)	0,591
T/T	15,7 % (25)	19,3 % (62)	
ADNasa1 Q222R			
A/A	8,7 % (14)	11,0 % (35)	
A/G	38,9 % (62)	36,3 % (117)	0,721
G/G	52,3 % (83)	52,7 % (170)	
PADI-4 89-104			
Haplotipo 1 Homocigota	35,6 % (57)	38,1 % (123)	0,118
Heterocigota	39,6 % (63)	45,2 % (145)	
Haplotipo 2 Homocigota	24,8 % (39)	16,7 % (54)	

Los datos están expresados como porcentajes (n total).

Estos resultados indicarían que habría una frecuencia significativamente mayor de individuos portadores de las variantes FV Leiden y FII20210A en el grupo de pacientes con ETV respecto del grupo control.

Con respecto a las variantes FGG 10034C/T, FXI 7872C/T, ADNasa1Q222R y al haplotipo PADI-4 89-104, no habría diferencias significativas (p>0,05) en las distribuciones de sus genotipos entre los grupos con ETV y control. Subsiguientemente, analizamos si la portación en particular de alguno de estos alelos podría estar asociado a un mayor riesgo a sufrir ETV, evaluando sus efectos bajo modelos específicos de dominancia alélica. En la tabla 3 se muestran los resultados de estos análisis.

Tabla 3. Distribución de las variantes FGG C10034T y FXI C7872T bajo distintos modelos de dominancia alélica en ETV con relación al grupo control.

Variante genética	ETV (n=159)	Control (n=322)	*p*
FGG 10034C/T			
Modelo: alelo T dominante			
C/C	57,2 % (91)	65,2 % (210)	0,089
C/T + T/T	42,8 % (68)	34,8 % (112)	
FXI 7872C/T			
Modelo: alelo C recesivo			
C/C	30,2 % (48)	27,3 % (88)	0,512
C/T + T/T	69,8 (111)	72,7 % (234)	

Los datos están expresados como porcentajes (n total).

Los resultados de este análisis indican que no habría asociación entre la portación del alelo T de la variante FGG 100034, ya sea en forma homocigota como heterocigota (modelo dominante) ni la del genotipo homocigota C/C de la variante FXI 7872 (modelo recesivo) con una mayor predisposición a sufrir ETV.

Dado que estos análisis preliminares sólo permiten analizar asociación sin tener en cuenta el posible efecto de otras covariables, posteriormente, hicimos distintos análisis de regresión logística binaria considerando todas las variantes genéticas como covariables ajustados por edad debido a la diferencia significativa en la mediana de edad observada al comparar ambos grupos. Los resultados de este análisis indicaron que la portación del FV Leiden, ya sea en estado homocigota como heterocigota, sería una variable independientemente asociada a unas chances más de 7 veces mayores de sufrir ETV (OR = 7,61 [3,16-18,29]; p<0,001). Por su parte, la portación de la variante FII20210A no sería una variable independientemente asociada a sufrir un mayor riesgo de sufrir ETV, sino que sólo se observaría una tendencia en su asociación (OR = 1,88 [0,82-4,33]; p=0,133).

Luego, hicimos una aproximación preliminar para establecer un *"score genético de riesgo" utilizando* como criterio la suma de portación de genotipos de riesgo. Estos genotipos de riesgo fueron establecidos en base a una combinación de los resultados de nuestros análisis previos y de lo establecido en trabajos publicados previamente. De esta manera, la portación variante FV Leiden sumaría dos puntos y la de cualquiera de las siguientes variantes FII 2010A, genotipos C/T o T/T de FGG 10034 y genotipo C/C de FXI 7872 sumaría un punto en el *"score genético de riesgo"*.

Tabla 4. Distribución de puntajes de acuerdo al "*score genético de riesgo*" en pacientes con ETV con relación al grupo control.

Puntaje	ETV (n =159)	Control (n = 322)	*p*
0	33,3 % (53)	46,3 % (149)	
1	37,8 % (60)	40,4 % (130)	
2	18,9 % (30)	11,8 % (38)	<0,001
3	7,6 % (12)	0,9 % (3)	
4	2,5% (4)	0,6% (2)	

Los datos están expresados como porcentajes (n total).

Los resultados del análisis descripto en la tabla 4 indicarían que los pacientes con ETV tendrían sumas de genotipos de riesgo significativamente mayores (p<0,001) en comparación con los individuos del grupo control.

Posteriormente, analizamos y comparamos la distribución de las distintas variantes genéticas estudiadas entre los subgrupos de pacientes con ETV espontánea y ETV asociadas a factores de alto y bajo riesgo.

Tabla 5. Distribución genotípica de las variantes genéticas en pacientes con ETV espontánea y asociadas a factores de alto y bajo riesgo.

Variante genética	Espontánea (n =98)	Asociada a factor de alto riesgo (n = 31)	Asociada a factor de bajo riesgo (n = 30)	*p*
FVL				
G/G	86,4 % (84)	93,5 % (29)	76,7 % (23)	0,143
G/A	13,6 % (14)	6,5 % (2)	23,3 % (7)	
A/A				
FII 20210A				
G/G	88,7 % (87)	96,8 % (30)	93,2 % (28)	0,38
G/A	11,3 % (11)	3,2 % (1)	6,8 % (2)	
FGG 10034C/T				
C/C	58,2 % (57)	54,8 % (17)	56,7 % (17)	0,327
C/T	31,6 % (31)	45,1 % (14)	36,7 % (11)	
T/T	10,2 % (10)	0,0 % (0)	6,7 % (2)	
FXI 7872C/T				
C/C	25,5 % (25)	32,1 % (10)	36,7 % (11)	0,302
C/T	54,1 % (53)	58,1 % (18)	56,7 % (17)	
T/T	20,4 % (20)	9,7 % (3)	6,7 % (2)	
ADNasa1 Q222R				
A/A	7,2 % (7)	11,1 % (3)	56,7 % (17)	
A/G	42,2 % (41)	33,3 % (10)	36,7 % (11)	0,472
G/G	50,6 % (50)	55,6 % (17)	6,7 % (2)	

Los datos están expresados como porcentajes (n total).

Los resultados de los análisis que se describen en la tabla 5 indican que no habría diferencias significativas en la distribución de ninguna de las cinco variantes genéticas estudiadas entre los grupos de pacientes que sufrieron ETV de tipo espontánea o asociadas a algún factor de riesgo establecido, ya sea de alto o bajo riesgo. Sin embargo, se observó una tendencia a que sea mayor la frecuencia de las variantes FVL, FII 20210A y FGG 10034 C/C en los pacientes con ETV espontánea o asociada a un factor de bajo riesgo.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación indicarían que la portación de la variante FV Leiden sería un factor independientemente asociado a un mayor riesgo de sufrir ETV. Estos resultados acerca del efecto protrombótico de dicha variante genética concuerdan

con lo establecido en diferentes estudios publicados. [12,14,16-18,46] Mientras tanto, nuestros hallazgos respecto de la portación del resto de las variantes genéticas estudiadas (FII 20210A, FGG 10034C/T, FXI 7872C/T y ADNasa1 Q222R) indicarían que ninguna es un factor que, independientemente de otras variables, aumente el riesgo de sufrir ETV. Considerando lo que ha sido claramente establecido en diversas investigaciones, podría resultar llamativo que nuestros resultados indicasen que la variante FII 20210A no sea un factor de riesgo independiente de ETV. Sin embargo, encontramos una proporción de portadores de esta variante significativamente mayor en el grupo con ETV en comparación con el grupo control.[12,15-18,46]

En estudios previos, se determinó que el alelo T de la variante genética FGG 10034C/T y el alelo C de la variante FXI 7872C/T tendrían, mediante diferentes mecanismos, efectos protrombóticos. El alelo T del FGG 10034 lo haría al provocar una disminución la proporción de la cadena de fibrinógeno □´, la cual posee un sitio de unión a trombina que le permite inhibir la acción de dicha enzima, mientras que el alelo C del FXI 7872 sería el responsable de un aumento en la actividad transcripcional del gen del factor XI.[21-24] En estudios de asociación genética a gran escala, se concluyó que ambas variantes serían factores de riesgo para desarrollar ETV sólo para portadores homocigotas de cualquiera de ellas.[16,17] En consecuencia, pese a no haber observado, en nuestro primer análisis, diferencias significativas en las distribuciones de sus genotipos entre los grupos con ETV y control decidimos hacer un segundo análisis de dichas distribuciones bajo diferentes modelos de dominancia alélica. Los resultados de este análisis indican claramente que no habría asociación entre la portación del genotipo homocigota C/C de la variante FXI 7872 (modelo recesivo) con una mayor predisposición a sufrir ETV. Mientras tanto, para la variante FGG 100034 encontramos que la portación del alelo T de la variante, ya sea en forma homocigota como heterocigota (modelo dominante) sólo mostraría una tendencia marginal a estar frecuentemente más presente en los pacientes con ETV. Sin embargo, no sería un factor de riesgo independiente para esta patología.

Como hemos mencionado previamente, la etiología de la ETV es multifactorial y los factores de riesgo que han sido descriptos difieren de manera significativa en su aporte al aumento en el riesgo de provocar la patología por lo que pueden diferenciarse factores de alto y bajo riesgo. Las variantes genéticas que analizamos en este estudio siempre han sido consideradas de bajo riesgo comparadas con algunos factores como las deficiencias de AT, PC o PS, cirugías mayores, ciertos tipos de tumores, entre otros. Por lo tanto, a pesar del escaso valor predictivo podrían tener por sí solas cada una de estas variantes genéticas sobre el aumento en el riesgo ETV su combinación podría mejorar la capacidad predictiva y ser usada en modelos de susceptibilidad a desarrollar ETV.[16,41,42,47] De hecho, algunos *"scores"* que han sido diseñado incluyendo factores genéticos y factores circunstanciales tales como cirugías, embarazo, inmovilización, neoplasias, viajes prolongados, uso de anticonceptivos orales, obesidad, entre otros, han mostrado valores predictivos muy promisorios, ya sea en población general como en familias con trombofilia hereditaria.[16,42-44,48]

Para analizar esto, decidimos hacer una aproximación preliminar para establecer un *"score genético de riesgo"*. Basándonos en una combinación de nuestros resultados y de lo establecido en trabajos publicados previamente, determinamos que la portación de la variante FV Leiden sumaría dos puntos y la de cualquiera de las siguientes variantes FII 2010A, genotipos C/T o T/T de FGG 10034 y genotipo C/C de FXI 7872 sumaría un punto en el *"score genético de riesgo"*. Los resultados de este análisis mostraron que la distribución de los puntajes de este *"score"* entre ambos grupos resultó ser significativamente diferente, siendo los pacientes con ETV quiénes presentaron mayores

sumas de genotipos de riesgo. Pese a que este análisis tiene algunas limitaciones, tal como el haberle otorgado valores arbitrarios a la portación de cada variante o genotipo en lugar de ponderar el efecto de cada una, consideramos que son resultados interesantes y promisorios. Además, creemos que son evidencia de que la combinación de variantes genéticas de bajo riesgo podría mejorar el valor predictivo de modelos de susceptibilidad a desarrollar ETV, pese a que la portación de algunas de dichas variantes tenga un efecto débil en forma independiente. Estos resultados preliminares serían coincidentes con lo postulado en trabajos previos, en los que se estableció que la identificación de nuevos predictores genéticos, la combinación de ellos y también con otros factores de riesgo circunstanciales en el armado de *"scores de riesgo"* podría ser una herramienta de gran utilidad para la predicción de ETV.[44,45,47-50] En caso de que sea así, podrían ser utilizados para definir perfiles que permitan identificar grupos de riesgo para ETV en los cuales se pueda implementar, a futuro, estrategias de prevención.

Por otro lado, la tendencia observada respecto de una mayor frecuencia de las variantes FVL, FII 20210A y FGG 10034 C/C en los pacientes que sufrieron ETV espontánea o asociada a un factor de bajo riesgo en comparación con aquéllos que tuvieron ETV asociada a un factor de alto riesgo podría estar reflejando que la combinación de distintos factores de riesgo, especialmente los de bajo riesgo, es fundamental en la etiología de esta patología.

Estos son los primeros resultados que existen, hasta el momento, en Argentina acerca de la prevalencia de las variantes genéticas estudiadas y de su posible asociación con ETV.

REFERENCIAS

1. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. Physiol Rev 2013;93:327-58.
2. Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. J Clin Invest 2012;122:2331-6.
3. Goldhaber SZ, Bounameaux H. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis. Lancet 2012;379:1835-46.
4. Thrombosis: a major contributor to the global disease burden. J Thromb Haemost 2014;12:1580-90.
5. Heit JA. Epidemiology of venous thromboembolism. Nat Rev Cardiol 2015;12:464-74.
6. Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. Blood Transfus 2011;9:120-38.
7. Baylis RA, Smith NL, Klarin D, Fukaya E. Epidemiology and Genetics of Venous Thromboembolism and Chronic Venous Disease. Circ Res 2021;128:1988-2002.
8. Zoller B, Svensson PJ, Dahlback B, Lind-Hallden C, Hallden C, Elf J. Genetic risk factors for venous thromboembolism. Expert Rev Hematol 2020;13:971-81.
9. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. N Engl J Med 2008;359:938-49.
10. Reitsma PH, Versteeg HH, Middeldorp S. Mechanistic view of risk factors for venous thromboembolism. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012;32:563-8.

11. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994;369:64-7.

12. Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. N Engl J Med 2001;344:1222-31.

13. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). Blood 1995;85:1504-8.

14. Voorberg J, Roelse J, Koopman R, et al. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. Lancet 1994;343:1535-6.

15. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood 1996;88:3698-703.

16. de Haan HG, Bezemer ID, Doggen CJ, et al. Multiple SNP testing improves risk prediction of first venous thrombosis. Blood 2012;120:656-63.

17. Greliche N, Germain M, Lambert JC, et al. A genome-wide search for common SNP x SNP interactions on the risk of venous thrombosis. BMC Med Genet 2013;14:36.

18. Germain M, Saut N, Greliche N, et al. Genetics of venous thrombosis: insights from a new genome wide association study. PloS one 2011;6:e25581.

19. Tang W, Teichert M, Chasman DI, et al. A genome-wide association study for venous thromboembolism: the extended cohorts for heart and aging research in genomic epidemiology (CHARGE) consortium. Genet Epidemiol 2013;37:512-21.

20. Lee S, Lee CH, Seo MS, Yoo JI. Integrative analyses of genes about venous thromboembolism: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. Medicine (Baltimore) 2022;101:e31162.

21. Uitte de Willige S, de Visser MC, Houwing-Duistermaat JJ, Rosendaal FR, Vos HL, Bertina RM. Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen gamma' levels. Blood 2005;106:4176-83.

22. Uitte de Willige S, Rietveld IM, De Visser MC, Vos HL, Bertina RM. Polymorphism 10034C>T is located in a region regulating polyadenylation of FGG transcripts and influences the fibrinogen gamma'/gammaA mRNA ratio. J Thromb Haemost 2007;5:1243-9.

23. Li Y, Bezemer ID, Rowland CM, et al. Genetic variants associated with deep vein thrombosis: the F11 locus. J Thromb Haemost 2009;7:1802-8.

24. Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. N Engl J Med 2000;342:696-701.

25. Franchini M, Mannucci PM. ABO blood group and thrombotic vascular disease. Thromb Haemost 2014;112:1103-9.

26. Dentali F, Sironi AP, Ageno W, et al. Non-O blood type is the commonest genetic risk factor for VTE: results from a meta-analysis of the literature. Semin Thromb Hemost 2012;38:535-48.

27. Zhou S, Welsby I. Is ABO blood group truly a risk factor for thrombosis and adverse outcomes? World J Cardiol 2014;6:985-92.

28. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. J Exp Med 2012;209:819-35.

29. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 2004;303:1532-5.

30. Medina E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. J Innate Immun 2009;1:176-80.

31. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010;107:15880-5.

32. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, et al. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. Blood 2011;118:1952-61.

33. Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. Blood 2011;117:1400-7.

34. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. Nat Med 2010;16:887-96.

35. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. J Thromb Haemost 2012;10:136-44.

36. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. Blood 2014;123:2768-76.

37. Wang Y, Li M, Stadler S, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. J Cell Biol 2009;184:205-13.

38. Suzuki A, Yamada R, Chang X, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. Nat Genet 2003;34:395-402.

39. Yasuda T, Ueki M, Takeshita H, et al. A biochemical and genetic study on all non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the gene encoding human deoxyribonuclease I potentially relevant to autoimmunity. Int J Biochem Cell Biol 2010;42:1216-25.

40. Camicia G, Munoz SA, Allievi A, et al. Association between severe disease course and nephritis with Q222R polymorphism in DNAse I gene among lupus patients: An Argentine multicenter study. Acta Reumatol Port 2016;41:138-44.

41. Nagalla S, Bray PF. Personalized medicine in thrombosis: back to the future. Blood 2016;127:2665-71.

42. Soria JM, Morange PE, Vila J, et al. Multilocus genetic risk scores for venous thromboembolism risk assessment. J Am Heart Assoc 2014;3:e001060.

43. Cohen W, Castelli C, Suchon P, et al. Risk assessment of venous thrombosis in families with known hereditary thrombophilia: the MARseilles-NImes prediction model. J Thromb Haemost 2014;12:138-46.

44. Bruzelius M, Bottai M, Sabater-Lleal M, et al. Predicting venous thrombosis in women using a combination of genetic markers and clinical risk factors. J Thromb Haemost 2015;13:219-27.

45. Janssens AC, Aulchenko YS, Elefante S, Borsboom GJ, Steyerberg EW, van Duijn CM. Predictive testing for complex diseases using multiple genes: fact or fiction? Genet Med 2006;8:395-400.

46. Middeldorp S, van Hylckama Vlieg A. Does thrombophilia testing help in the clinical management of patients? British journal of haematology 2008;143:321-35.

47. Crous-Bou M, Harrington LB, Kabrhel C. Environmental and Genetic Risk Factors Associated with Venous Thromboembolism. Semin Thromb Hemost 2016;42:808-20.

48. Horvei LD, Braekkan SK, Smith EN, et al. Joint effects of prothrombotic genotypes and body height on the risk of venous thromboembolism: the Tromso study. J Thromb Haemost 2018;16:83-9.

49. Crous-Bou M, De Vivo I, Camargo CA, Jr., et al. Interactions of established risk factors and a GWAS-based genetic risk score on the risk of venous thromboembolism. Thromb Haemost 2016;116:705-13.

50. Lo Faro V, Johansson T, Johansson A. The risk of venous thromboembolism in oral contraceptive users: the role of genetic factors-a prospective cohort study of 240,000 women in the UK Biobank. Am J Obstet Gynecol 2023.

ABSTRACT

Venous Thromboembolism (VTE) is a pathology of multifactorial etiology. Among their risk factors, there are both genetic and circumstantial factors. The discovery of new prothrombotic genetic variants and their combination with other risk factors to develop "*predictive scores*" could be very useful tools to identify risk groups for VTE in which to implement prevention strategies.

The main objectives of this study were to analyze whether different genetic variants are associated with an increased predisposition to developing VTE and to establish a *"risk score"* that might improve the predictive ability to distinguish individuals prone to suffer VTE.

We carried out an observational, descriptive, case-control study that included 481 individuals in a 2:1 ratio of controls (n=322) and VTE patients (n=159). The diagnosis of VTE was confirmed by ultrasonography in all patients. Specific demographic, clinical and biological variables about VTE patients were registered. The distribution of different genetic variants in both VTE patients and controls were studied.

The results of this study showed that being carrier of FV Leiden would be independently associated with an odd more than 7 times higher of suffering VTE (p<0,001). Besides,

through establishing an approximate *"genetic risk score"*, it was found that VTE patients would have significantly higher sums of risk genotypes (p<0,001) than controls. Furthermore, a tendency towards a higher frequency of the FVL, FII 20210A and FGG 10034 C/C genetic variants in patients with spontaneous or low risk factor associated-VTE compared with high risk factor associated-VTE was observed.

The results from the study would be promising as they evidenced that the combination of genetic low risk variants might improve the predictive ability of VTE susceptibility models. Moreover, the tendency observed of a higher frequency of these variants in patients with spontaneous VTE or VTE associated with other known low risk factors would highlight that the combination of risk factors would be essential in the etiology of this multifactorial pathology.

ROL DEL EJE IL33/ST2 EN EL RECHAZO CRÓNICO DE TRASPLANTE HEPÁTICO HUMANO

Paula Constanza Arriola Benítez, Marco Santillán, Luis Pérez Illidge, Jeremías Moreira, Araceli Castro, Victoria Atencio, María Florencia Fernández, Claudio Tiribelli, Valeria Descalzi, Martín Rumbo, María Virginia Gentilini, Gabriel Gondolesi

Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería.
IMETTyB - CONICET - Universidad Favaloro

INTRODUCCIÓN

El trasplante hepático constituye la única opción curativa para diferentes enfermedades hepáticas terminales. En Argentina, durante el año 2019 se realizaron 523 trasplantes hepáticos, representando el 22,4% del total de trasplantes[1]. A pesar de los avances logrados, los cuales incrementaron la supervivencia de los pacientes, el rechazo sigue siendo un problema de gran relevancia[1-3]. El rechazo celular tiene una frecuencia del 15-25% y generalmente con tratamiento es reversible[4-6]. Sin embargo, el 3 a 17% de los pacientes presenta rechazo crónico del injerto (CR)[7-9]. El CR provoca daño de los vasos intrahepáticos y de los conductos biliares y representa una importante causa de daño del órgano trasplantado, el cuál puede ser irreversible y en consecuencia provocar la pérdida del órgano con la necesidad de un nuevo trasplante. Hasta el momento, los mecanismos inmunobiológicos implicados en el CR no han sido completamente dilucidados.

La patogénesis del rechazo de los órganos sólidos es compleja y multifactorial, se caracteriza por la obliteración arterial, inflamación intersticial, disrupción de los órganos linfáticos asociados, ductopenia y fibrosis[2]. La fibrosis progresiva asociada a rechazo crónico es un proceso de gran importancia que conlleva a la pérdida de la función del órgano[10].

La fibrogénesis hepática es un mecanismo fisiológico importante en la cicatrización de heridas y reparación tisular durante la injuria hepática[11]. Sin embargo, un proceso fibrogénico descontrolado, perpetuado en el tiempo y acompañado por una respuesta inflamatoria concluye en la fibrosis hepática la cual puede progresar a condiciones tales como cirrosis y carcinoma hepatocelular conllevando finalmente a la pérdida total de la funcionalidad del hígado[11-15]. El mecanismo de fibrosis consiste en la diferenciación de las células estrelladas hepáticas en miofibroblastos, los cuales producen gran cantidad de matriz extracelular[15]. Esta diferenciación es mantenida por la interacción entre las células inmunes y las células hepáticas residentes[16].

Una de las vías inflamatorias involucradas en el proceso de fibrosis hepática es el eje ST2/IL-33[17,18]. IL-33 es una alarmina crítica en la inflamación, pertenece a la familia de IL-1, y es liberada al microambiente tisular frente a una injuria o luego de necrosis. IL33 ejerce sus funciones biológicas a través de la señalización vía su receptor específico ST2. IL-13 (entre otras), es producida en respuesta a la secreción de IL-33 manteniendo la

diferenciación de las células estrelladas hepáticas en su fenotipo profibrogénico[19,20]. Una vez activadas, las células estrelladas hepáticas promueven la fibrosis a través de la expresión de factores profibrogénicos tales como IL-6, TGF-β, y colágeno[16].

El eje ST2/IL-33 ejerce una función importante en la respuesta inmune innata y adaptativa[22], dependiendo del microambiente en el que se encuentre presente, IL-33 puede promover respuestas inmunes de distintos perfiles[23]. El rol de IL-33 en la respuesta aloinmune es un área poco explorada y controvertida. En lo que refiere al trasplante hepático, no hay reportes acerca del rol inmunológico de IL-33, determinar el mismo nos permitirá considerar a la modulación de esta citoquina, ya sea directa o indirectamente a través del bloqueo de su receptor, como una alternativa terapéutica.

En este contexto, el objetivo general del trabajo fue evaluar los mecanismos inmunológicos involucrados en la fisiopatología del rechazo hepático, particularmente estudiar el eje ST2/IL33 durante el proceso de rechazo hepático crónico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cohorte de estudio: Grupo Control: muestras de tejido hepático obtenidos de donantes de hígado sanos previo a la implantación del órgano (n=9). Grupo Sin rechazo: Pacientes adultos con trasplante hepático en seguimiento por el Servicio de Hepatología de la Fundación Favaloro que no presentaron evidencias a nivel histopatológico de rechazo (n=9). Grupo Rechazo crónico: Pacientes adultos con trasplante hepático en seguimiento por el Servicio de Hepatología de la Fundación Favaloro con rechazo crónico del injerto (n=3). El presente proyecto, así como los formularios de consentimiento informado del paciente han sido presentados y aprobados por el Comité de Ética e Investigación de la Fundación Favaloro (DDI (1490) 2419 CBE 778/19).

Obtención de muestras: Se obtuvieron muestras de tejido hepático mediante biopsia percutánea con guía ecográfica. De dichas biopsias, una parte se destinó al análisis histopatológico a cargo del Servicio de Patología del Hospital Universitario Fundación Favaloro y otra parte fue almacenada en RNALater para evitar la degradación y conservadas a -80°C hasta su procesamiento para el estudio de expresión génica (Tabla 1).

Análisis de expresión génica: A partir de las biopsias hepáticas, se obtuvo el RNA total utilizando columnas comerciales (ZymoReasearch) y se realizó la transcripción reversa (M-MLV, Invitrogen) empleando random primers y 1µg de ARN total. Por qPCR se determinó la expresión de il33, ST2 total, ST2 soluble, α-sma, tgf-β utilizando FastStart Universal syber green Master Mix (Sigma). Como gen de referencia se utilizó GAPDH. Las secuencias de los primers utilizados fueron: *il33* Fw CACCCCTCAAATGAATCAGG- Rv GGAGCTCCACAGAGTGTTCC; *ST2t* Fw GACGGCGACCAGGTCCTT- Rv GGGCTCCGATTACTGGAAACA; *St2s* Fw GAAGGCACACCGTAAGACTA -Rv GACAAACCAACGATAGGAGG; *Tgf-b* Fw CGAGCCTGAGGCCGACTAC- Rv AGATTTCGTTGTGGGTTTCCA; *ACTA1* Fw ACTGAGCGTGGCTATTCCTCCGTT- Rv GCAGTGGCCATCTCATTTTCA; *GAPDH* Fw AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC – Rv GGGGTCATTGATGGCAACAATA.

Tabla 1: Características de los pacientes incluidos en este estudio.

BX HEPÁTICAS PARA ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA		
Grupo	NR (n=9)	CR (n=4)
Edad del receptor al momento del Tx (años)	49,4 ± 4,6	19,75 ± 10
Sexo (Mujer: Hombre)	2:7	0:4
Enfermedad de base		
Autoinmune	4	2
Metabólica	2	0
Cirrosis alcohólica	1	0
Otra	2	2
Edad del receptor al momento del muestreo (años)	50 ± 4,6	28,3 ± 5,5
Tiempo postTx	189,7 ± 58,4	3046 ± 1889
Inmunosupresión		
Tacro + Delti	0	2
Tacro + Delti + MMF	5	0
FK + Delti	2	0
Delti	1	0
Tacro	0	2
BX HEPÁTICAS PARA INMUNOHISTOQUÍMICA		
Grupo	NR (n=12)	CR (n=8)
Edad del receptor al momento del Tx (años)	54,1 ± 4,1	23,4 ± 8,3
Sexo (Mujer:Hombre)	1:11	2:6
Edad del receptor al momento del muestreo (años)	52,3 ± 4,1	31,4 ± 11,1
Tiempo postTx	340,3 ± 55,1	3163 ± 1118,3

Inmunohistoquímica: Para el diagnóstico histopatológico, las biopsias hepáticas son fijadas en formol, deshidratadas y posteriormente incluidas en bloques de parafina. Estos mismos bloques fueron utilizados para el presente protocolo de investigación. Se determinó la frecuencia de poblaciones de células inmunes mediante tinción con anticuerpos específicos anti-CD3, -CD4, -CD8 por inmunohistoquímica siguiendo los protocolos ya descriptos por nuestro laboratorio.

Evaluación histopatológica: Las características histopatológicas en las biopsias hepáticas de pacientes tales como el grado de severidad de la fibrosis mediante la escala de METAVIR (Fibrosis leve: F1, moderada: F2 y cirrótico: F3 y F4), fue realizado por el Servicio de Patología del Hospital Universitario Fundación Favaloro.

Estadística: Se realizaron múltiples comparaciones de los parámetros inmunológicos, los datos recopilados del laboratorio (bilirrubina total (TB) y enzimas hepáticas como AST, ALT y ALP), así como el análisis histopatológico (grado METAVIR) utilizando el test de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn. Las correlaciones se evaluaron con la prueba de correlación de rangos de Spearman para muestras no paramétricas. Se utilizó el software GraphPad.

RESULTADOS

Los pacientes con rechazo crónico presentaron mayor frecuencia de linfocitos CD3+ a nivel hepático respecto de los trasplantados sin rechazo de injerto. La inmunidad celular tiene un rol preponderante en la ocurrencia y desarrollo del rechazo y tolerancia del aloinjerto. IL-33 es una citoquina fuertemente inmunomoduladora que dependiendo del microambiente tisular puede dirigir procesos inflamatorios o de reparación tisular. Particularmente en el contexto de trasplantes, el rol de IL-33 es controvertido.

Inicialmente nos propusimos caracterizar el infiltrado inflamatorio en el hígado de pacientes trasplantados. Para esto evaluamos la frecuencia y distribución de las poblaciones de linfocitos CD3, CD4 y CD8 por inmunohistoquímica. Observamos un aumento significativo de células CD3+ en las muestras CR en el área periportal, así como un mayor número de linfocitos CD4+ y CD8+ en la zona lobular y periportal, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 1).

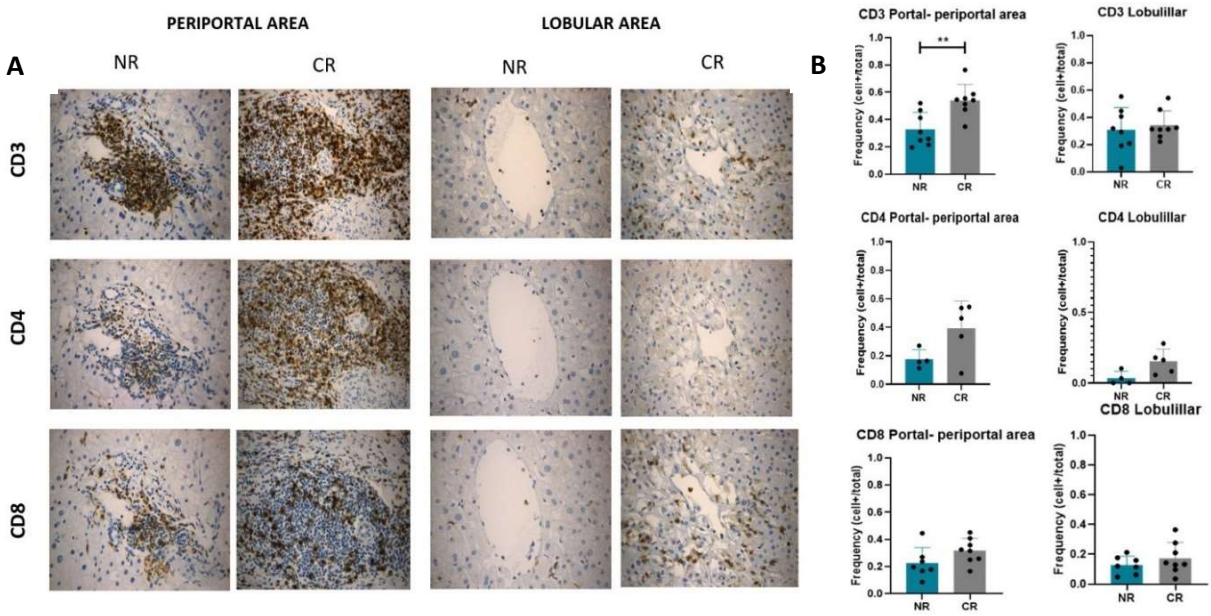


Figura 1: Frecuencia de células CD3+, CD4+ y CD8+ en el área periportal y lobular del hígado de pacientes trasplantados. **A.** Identificación de linfocitos CD3+ (NR, n=8; CR, n=8), CD4+ (NR, n=4; CR, n=5) y CD8+ (NR, n=7; CR, n=8) en tejido hepático de pacientes trasplantados mediante inmunohistoquímica. **B.** Frecuencia de las distintas poblaciones inmunes en el área portal y lobular. Se realizó el recuento de células con marcación positiva y con morfología linfoide en todos los espacios porta del corte histológico, la frecuencia fue calculada como células positivas/ total de células linfoides en el corte. **P< 0.01, Test de Mann Whitney.

La expresión de ST2 total (ST2t) está incrementada en el CR. El rol de IL-33 en la respuesta al trasplante hepático es un área aún poco explorada. El receptor de IL-33, ST2, es miembro de la familia de receptores de IL-1, posee una isoforma de transmembrana (ST2L) biológicamente activo y una soluble (ST2s) que actúa como receptor señuelo. Analizamos los niveles de expresión de IL-33 y de su receptor en el tejido hepático de pacientes trasplantados sin rechazo de injerto y con rechazo crónico. Como controles incluimos muestras hepáticas de donantes de hígado sanos tomadas previo a su implante en el receptor.

Observamos niveles más elevados de IL-33 en las muestras de rechazo crónico respecto de los controles sanos, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Además, el grupo CR tuvo un incremento en la expresión de ST2 total ($p<0.05$). Los niveles de ST2s fueron similares entre los diferentes grupos (Figura 2).

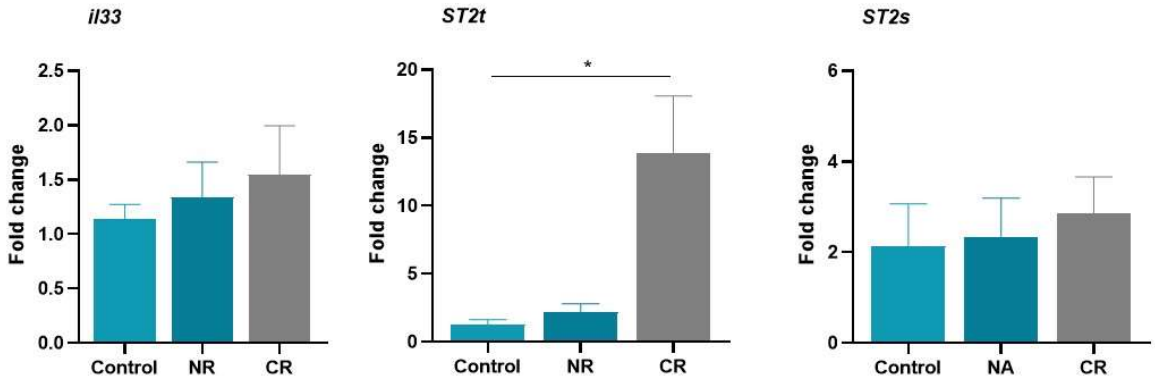


Figura 2: Expresión de IL-33/ST2 en muestras hepáticas de pacientes trasplantados. Se analizaron los niveles de expresión génica de IL-33, ST2total y ST2s en tejido hepático de donantes sanos (n=9), pacientes sin rechazo (n=9) y muestras de rechazo crónico (n=4) por PCR en tiempo real. El fold change se calculó con el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, como gen normalizador se utilizó GAPDH. *P<0.05, Test de Kruskall-Wallis seguido del post-test de Dunn.

Los niveles de ST2t se asocian positivamente al daño hepatocelular y colestático. Estudiamos la relación entre la expresión de ST2t y los de las enzimas ALT (alanina transaminasa), AST (aspartato transaminasa) y FAL (fosfatasa alcalina), BT (bilirrubina total) y GGT (gamma-glutamil-transferasa) en nuestra cohorte de pacientes trasplantados hepáticos. Observamos una correlación positiva entre los niveles de expresión de ST2t tisular y las transaminasas, así como también con los niveles de FAL y BT (Figura 3), no así con GGT.

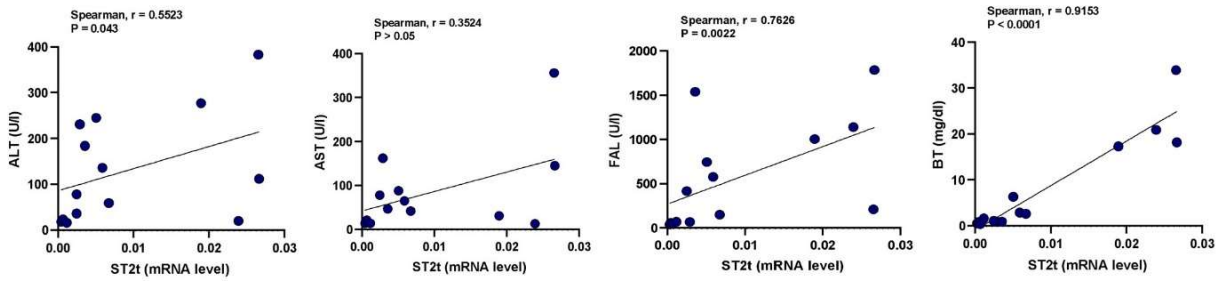
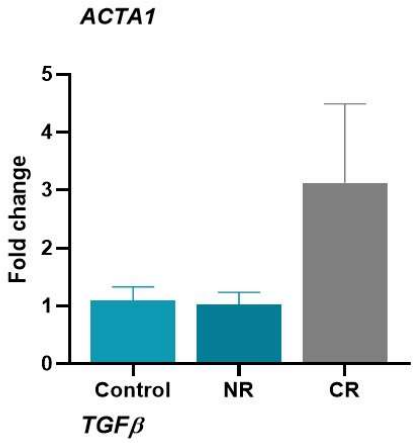
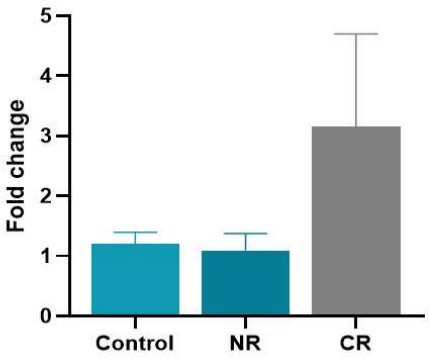


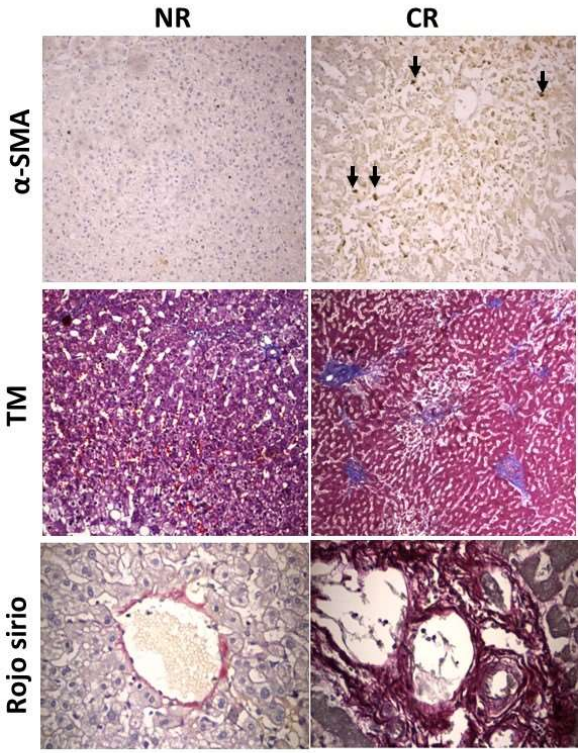
Figura 3: Relación entre los niveles de expresión de ST2t con las enzimas indicadoras de daño hepatocelular y de las vías biliares. Se evaluó la correlación entre los niveles hepáticos de ST2t y los de ALT, AST, FAL y BT obtenidos 72h post o pre toma de muestra de tejido hepático en los pacientes trasplantados mediante correlación de Spearman para muestras no paramétricas. Los niveles de ST2t fueron determinados por PCR en tiempo real y calculados con el método $2^{-\Delta CT}$ utilizando como gen normalizador GAPDH.

Activación de las células estrelladas de hígado en el rechazo crónico. Una de las poblaciones celulares más importantes en los procesos de fibrogénesis hepática son las células estrelladas. Frente a la injuria estas células pueden activarse y diferenciarse a miofibroblastos capaces de producir proteínas de la matriz extracelular. Dado que la fibrosis es un evento característico del rechazo crónico, evaluamos la expresión de actina-

alfa de músculo liso (α-SMA), marcador de activación de las células estrelladas, y de la citoquina profibrogénica TGF-β. El grupo CR presentó mayor expresión de α-SMA (gen ACTA1) y de TGF-β en relación a los controles y a las muestras de aloinjertos sin rechazo (Figura 4A y B), sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Además, α-SMA se correlacionó positivamente con el grado de fibrosis (METAVIR) en los pacientes trasplantados (Figura 4C). Para complementar los resultados de expresión génica, estamos optimizando las marcaciones por IHQ de α-SMA para identificar, cuantificar y evaluar la distribución de las células estrelladas en el tejido hepático. Por otro lado, se cuantificará la deposición de colágeno a partir de las tinciones con tricrómico de Masson y rojo sirio (Figura 4D).







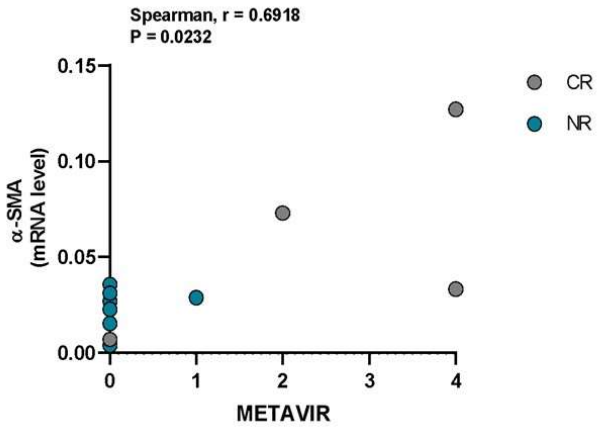


Figura 4: Marcadores de fibrosis hepática y activación de las células estrelladas en el hígado de pacientes con trasplante hepático. **A.** Se analizaron los niveles de expresión génica de ACTA1 y de TGF-β, en tejido hepático de donantes sanos (n=9), pacientes sin rechazo (n=9) y muestras de rechazo crónico (n=4) por PCR en tiempo real.B- El fold change se calculó con el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, como gen normalizador se utilizó GAPDH. Test de Kruskall-Wallis seguido de test de Dunn. **B.** Imágenes representativas de las tinciones por IHQ de α-SMA, tricrómico de Masson y rojo sirio para evaluar la deposisición de colágeno. C. Correlación entre los niveles de α-SMA y el METAVIR. Se utilizó la correlación de Spearaman.

CONCLUSIONES

El trasplante de órganos ha sufrido enormes avances en los últimos años, lo que permitió mejorar la calidad de vida de los pacientes y prolongar la supervivencia. Sin embargo, el rechazo de órgano y en particular el rechazo crónico sigue constituyendo un problema de gran relevancia. El rechazo crónico del aloinjerto hepático puede ocurrir hasta en un 17% de los casos y si no es detectado y tratado a tiempo puede progresar hasta la pérdida del órgano con la consecuente necesidad de un re-trasplante. La búsqueda de nuevas estrategias para minimizar los eventos de rechazo de trasplante es un área de investigación prioritaria debido a la carencia de investigaciones científicas en esta área y al costo económico-social que implica el rechazo del injerto.

Nuestros resultados evidenciaron mayor frecuencia de linfocitos CD3+ en el área porta, una tendencia al incremento en los niveles de IL-33 y un aumento de su receptor ST2 en el hígado de pacientes con rechazo crónico. Además, los niveles hepáticos de ST2 correlacionaron positivamente con el daño hepatocelular y colestático en los pacientes trasplantados. También observamos mayor expresión de la citoquina profibrogénica TGF-β y del marcador de activación α-SMA en el rechazo crónico. En conjunto estos resultados indicarían que el eje ST2/IL-33 es modulado durante el proceso de rechazo crónico en el trasplante hepático humano, sin embargo, es necesario aumentar el número de pacientes para una mayor comprensión de los mecanismos inmunobiológicos involucrados.

BIBLIOGRAFÍA

1. SINTRA-CRESI. Memoria 2019, procuración y trasplante de órganos, tejidos y células en argentina. 2019, https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2021-01/MEMORIA_2019.pdf.
2. Choudhary NS, Saigal S, Bansal RK, Saraf N, Gautam D, Soin AS. Acute and Chronic Rejection After Liver Transplantation: What A Clinician Needs to Know. *Journal of clinical and experimental hepatology* 2017;**7**(4):358-66. https://doi.org/10.1016/j.jceh.2017.10.003.
3. Neil DA, Hubscher SG. Histologic and biochemical changes during the evolution of chronic rejection of liver allografts. *Hepatology* 2002;**35**(3):639-51. https://doi.org/10.1053/jhep.2002.31726.
4. Rodriguez-Peralvarez M, Rico-Juri JM, Tsochatzis E, Burra P, De la Mata M, Lerut J. Biopsy-proven acute cellular rejection as an efficacy endpoint of randomized trials in liver transplantation: a systematic review and critical appraisal. *Transplant*

international : official journal of the European Society for Organ Transplantation 2016;**29**(9):961-73. https://doi.org/10.1111/tri.12737.

5. Gruttadauria S, Vasta F, Mandala L, Cintorino D, Piazza T, Spada M, et al. Basiliximab in a triple-drug regimen with tacrolimus and steroids in liver transplantation. *Transplantation proceedings* 2005;**37**(6):2611-3. https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.06.063.

6. Maluf DG, Stravitz RT, Cotterell AH, Posner MP, Nakatsuka M, Sterling RK, et al. Adult living donor versus deceased donor liver transplantation: a 6-year single center experience. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2005;**5**(1):149-56. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00654.x.

7. Demetris AJ, Murase N, Lee RG, Randhawa P, Zeevi A, Pham S, et al. Chronic rejection. A general overview of histopathology and pathophysiology with emphasis on liver, heart and intestinal allografts. *Annals of transplantation* 1997;**2**(2):27-44, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9869851.

8. Sher LS, Cosenza CA, Michel J, Makowka L, Miller CM, Schwartz ME, et al. Efficacy of tacrolimus as rescue therapy for chronic rejection in orthotopic liver transplantation: a report of the U.S. Multicenter Liver Study Group. *Transplantation* 1997;**64**(2):258-63, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9256184.

9. Jain A, Demetris AJ, Kashyap R, Blakomer K, Ruppert K, Khan A, et al. Does tacrolimus offer virtual freedom from chronic rejection after primary liver transplantation? Risk and prognostic factors in 1,048 liver transplantations with a mean follow-up of 6 years. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2001;**7**(7):623-30. https://doi.org/01.1053/jlts.2001.25364.

10. Blakolmer K, Seaberg EC, Batts K, Ferrell L, Markin R, Wiesner R, et al. Analysis of the reversibility of chronic liver allograft rejection implications for a staging schema. *The American journal of surgical pathology* 1999;**23**(11):1328-39, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555001.

11. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature reviews Immunology* 2014;**14**(3):181-94. https://doi.org/10.1038/nri3623.

12. Seki E, Brenner DA. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2015;**22**(7):512-8. https://doi.org/10.1002/jhbp.245.

13. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells* 2020;**9**(4). https://doi.org/10.3390/cells9040875.

14. Dhar D, Baglieri J, Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 2020;**245**(2):96-108. https://doi.org/10.1177/1535370219898141.

15. Cordero-Espinoza L, Huch M. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 2018;**128**(1):85-96. https://doi.org/10.1172/JCI93562.

16. Wang S, Friedman SL. Hepatic fibrosis: A convergent response to liver injury that is reversible. *Journal of hepatology* 2020;**73**(1):210-1. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.011.

17. Tan Z, Liu Q, Jiang R, Lv L, Shoto SS, Maillet I, et al. Interleukin-33 drives hepatic fibrosis through activation of hepatic stellate cells. *Cellular & molecular immunology* 2018;**15**(4):388-98. https://doi.org/10.1038/cmi.2016.63.

18. Kotsiou OS, Gourgoulianis KI, Zarogiannis SG. IL-33/ST2 Axis in Organ Fibrosis. *Frontiers in immunology* 2018;**9**:2432. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02432.

19. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology* 2008;**214**(2):199-210. https://doi.org/10.1002/path.2277.

20. Kohyama T, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Abe S, Rennard SI. IL-4 and IL-13 induce chemotaxis of human foreskin fibroblasts, but not human fetal lung fibroblasts. *Inflammation* 2004;**28**(1):33-7. https://doi.org/10.1023/b:ifla.0000014709.47056.a9.

21. Yilmaz F, Aydin U, Nart D, Zeytunlu M, Karasu Z, Kaya T, et al. The incidence and management of acute and chronic rejection after living donor liver transplantation. *Transplantation proceedings* 2006;**38**(5):1435-7. https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.02.108.

22. Schmitz, J., et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. Immunity 23, 479-490 (2005).

23. Molofsky, A.B., Savage, A.K. & Locksley, R.M. Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. Immunity 42, 1005-1019 (2015).

ABSTRACT

The improvements in the immunosuppression therapies have reduced the prevalence of chronic rejection (CR) of liver allografts, however CR still represents an important cause of graft loss. The interleukin-33 (IL-33)/suppression of tumorigenicity 2 (ST2) axis modulates immune response and it is critical in mediating hepatic fibrosis. Allograft fibrosis is the hallmark characteristic of the progression to liver CR. Considering that the biological mechanisms underlying this process remained not completely understood, our aim was to study the role of IL-33/ST2 axis in the immunopathology of CR after liver transplant (LT) in humans.

Liver biopsies and tissue samples were obtained from LT patients without any histopathological signs of rejection [NR=9, patients with chronic rejection [CR=4] and control samples from donor allograft [Control=9]. The frequency and distribution of immune cell populations were evaluated by immunohistochemistry. The expression levels of cytokines, α-SMA, ST2 were measured by qPCR.

Intrahepatic CD3 were increased in CR compared with NR group. Levels of IL-33 evidenced a slight increase in the CR group with respect to the control group, but this difference was not statistically significant. However, the expression of total ST2 was significantly increased in CR compared with the control group ($p< 0.05$). Moreover, ST2 levels correlated positively with altered levels of functional liver markers as TB, AST, ALT and ALP ($p<0.05$). α-SMA expressed by hepatic stellate cells reflects their

activation and has been directly related to experimental liver fibrogenesis. Levels of α-SMA and TGF-ß, were increased in the CR group compared with controls and the NR group ($p>0.05$). Moreover, the expression of α-SMA positively correlated with METAVIR score in LTx patients ($p<0.05$).

Our prelaminar data indicate that the IL-33/ST2 pathway is modulated in liver allograft in response to damage. Further studies in larger series need to be performed to obtain more insights into the biological function of this axis.

BRONQUIOLITIS POR VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO: BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES QUE PREDIGAN LA SEVERIDAD DE LA INFECCIÓN EN NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS

Lourdes Arruvito

Hospital General de Niños Pedro de Elizalde.
INBIRS - Facultad de Medicina. UBA - CONICET

ANTECEDENTES

A nivel mundial, la OMS estima que el Virus Sincicial Respiratorio (VSR) es responsable de 30 millones de episodios de infecciones respiratorias en niños, cada año. En Argentina representa la principal causa de mortalidad en niños menores de 5 años, principalmente provenientes de familias con bajos recursos (1). Estos datos demuestran claramente un patrón de inequidad, ya que, para los niños nacidos en situación de pobreza, la infección por VSR puede convertirse en una cuestión de vida o muerte.

La patogenia de la infección por VSR guarda estrecha relación con el desarrollo de un severo cuadro inflamatorio que integra mecanismos inmunes propios tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa (2). En relación a la infección por VSR resulta pertinente destacar que: a) no disponemos aún de una vacuna efectiva; b) no resulta clara la naturaleza de los factores que determinan la severidad del cuadro clínico; c) no comprendemos la razón por la cual, el desarrollo de memoria inmunológica frente a la infección es sumamente ineficiente y d) no comprendemos tampoco los mecanismos subyacentes al desarrollo tardío de manifestaciones asmáticas en los niños que cursan infección severa por VSR.

A través de un proyecto colaborativo que iniciamos en 2012 con el Hospital de Niños "Pedro de Elizalde", logramos caracterizar tres aspectos relevantes propios a la infección por VSR:

1. Observamos que la infección por VSR en niños menores de un año se asocia a la "desaparición" del pool circulante de células T regulatorias, fenómeno que pareciera asociarse con su diferenciación y/o inducción de un perfil pro-inflamatorio Th17 (Am J Respir Crit Care Med.2014).
2. Encontramos que las células T CD4+ son permisivas a la infección por VSR y que la frecuencia de células T CD4+ circulantes infectadas correlaciona con la severidad del cuadro clínico (J Infect Dis.2017).
3. Caracterizamos un nuevo defecto funcional en las células T CD4+ de los niños infectados: un estado refractario a la acción de la IL-2 que podría condicionar la puesta en marcha de una respuesta inmune protectora y, particularmente, el desarrollo de una respuesta de memoria (J Infect Dis.2018).

Los candidatos vacunales contra el VSR se evalúan principalmente en función de su capacidad para inducir anticuerpos neutralizantes (3). Sin embargo, los anticuerpos también pueden modificar el curso de la enfermedad a través de su interacción con los receptores para el fragmento Fc de la IgG modificando la función de diferentes poblaciones leucocitarias y/o facilitando la infección de las células blanco (4). Las células T y los anticuerpos representan dos componentes centrales propios a la respuesta inmune adaptativa. Nuestros hallazgos preliminares indicando que las células T de niños que padecen infección severa por VSR expresan receptores para anticuerpos IgG (CD32) abren una nueva perspectiva en torno a los mecanismos regulatorios que operan sobre la respuesta T en el niño infectado. Estos nuevos mecanismos podrían explicar dos fenómenos clave en la infección por VSR: la incapacidad de los niños infectados de desarrollar una respuesta de memoria efectiva y la prevalencia de asma en los niños que han resuelto la infección aguda.

OBJETIVO

Habida cuenta que: (a) el único tratamiento profiláctico disponible para niños con factores de riesgo es el palivizumab, un anticuerpo neutralizante anti-VSR, (b) los anticuerpos pueden actuar como facilitadores de la infección, (c) los casos severos se producen en niños menores de 6 meses con elevados niveles de anticuerpos maternos anti-VSR, (d) las células T unen anticuerpos IgG vía CD32; el objetivo general de este proyecto es definir la participación del receptor CD32 presente en las células T y su interacción con los anticuerpos IgG en la inducción de una respuesta inmune protectora y/o deletérea durante la infección pediátrica por VSR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los anticuerpos séricos IgG específicos del VSR están presentes en la mayoría de los niños y adultos, lo que refleja la universalidad de la infección por el VSR durante toda la vida, y los anticuerpos neutralizantes siguen siendo una medida comúnmente aceptada de inmunidad protectora en los ensayos de vacunas (3). Sin embargo, los anticuerpos IgG podrían influir en el curso de la enfermedad por VSR no sólo actuando como anticuerpos neutralizantes, sino también activando las funciones efectoras a través de los receptores para la porción Fc de IgG (FcγR) (5). Estos receptores se expresan ampliamente en granulocitos, y células B. En cuanto a la expresión de los FcγR en células T aún es controvertido, aunque estudios recientes demostraron que una fracción minoritaria de células T expresa FcγR de tipo II (CD32) (6, 7). Este receptor de baja afinidad presenta 2 isoformas con función conocida, CD32a (activadora) y CD32b (inhibidora), las cuales difieren entre sí respecto de su dominio intracitoplasmático.

Para llevar a cabo este proyecto, empleamos muestras de sangre periférica (0.6 mL) de niños con infección severa por VSR (n=89) y de niños controles (n=29) del mismo grupo etario, a partir de las cuales se aislaron las células mononucleares (PBMCs). Los criterios de inclusión de los pacientes fueron los siguientes: menores de 2 años hospitalizados por infección severa por VSR, cuyo diagnóstico fue realizado por inmunofluorescencia de aspirados nasofaríngeos. Se excluyeron los niños con antecedentes de prematuridad, inmunodeficiencia, cardiopatía congénita y afecciones crónicas. Los niños controles fueron donantes sanos que ingresaron al hospital para una cirugía programada. Solo fueron incluidos aquellos niños que no habían padecido

infecciones en las vías respiratorias durante un período de 4 semanas antes de la toma de muestra. El estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital de Pediatría Pedro de Elizalde de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

En primer lugar, evaluamos la frecuencia de células T CD4+ y CD8+ que expresan CD32 en PBMCs de niños VSR+ y de niños sanos por citometría de flujo. Encontramos una mayor frecuencia de células T CD4+CD32+ y CD8+CD32+ en niños VSR+ en comparación con los niños sanos **(Figura 1).**

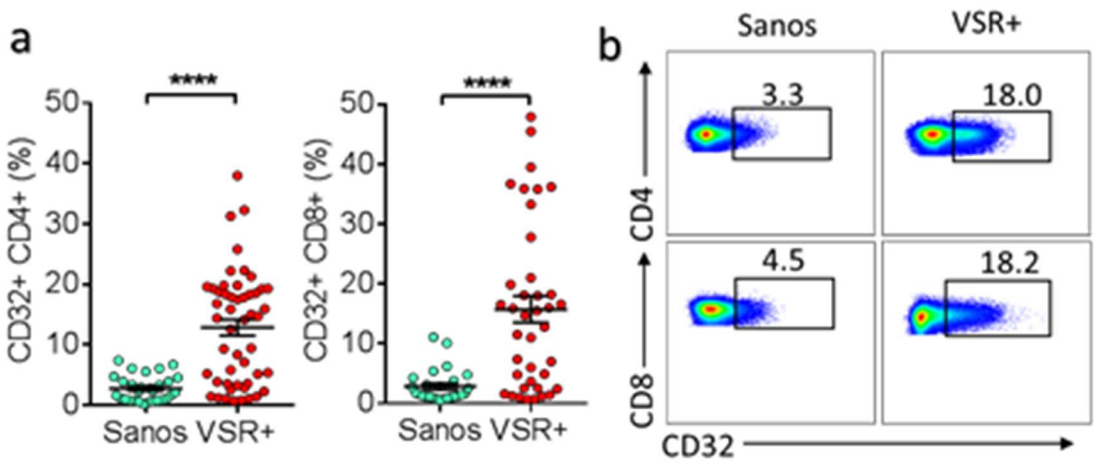


Figura 1: (a) Frecuencia de células T CD4+CD32+ y CD8+CD32+ en niños sanos (n=29) y niños con VSR (n=39 para CD8+ y n=50 para CD4+) analizado por citometría de flujo. Se usó un anticuerpo anti-CD32 humano (clon FUN-2). Test-T no pareado, (media±ESM; ****p<0.0001). (b) Dot plots representativos.

Debido a que no hay anticuerpos comerciales disponibles capaces de distinguir la porción extracelular entre la isoforma activadora CD32a y la inhibidoras CD32b, evaluamos la expresión relativa de las isoformas de CD32 por RT-qPCR en células T CD4 + y CD8+ purificadas de los niños VSR+. Los niveles de ARNm de CD32a fueron notablemente más altos que los de CD32b tanto en las células T CD4+ como CD8+ (**Figura 2**), mostrando un predominio de la isoforma activadora.

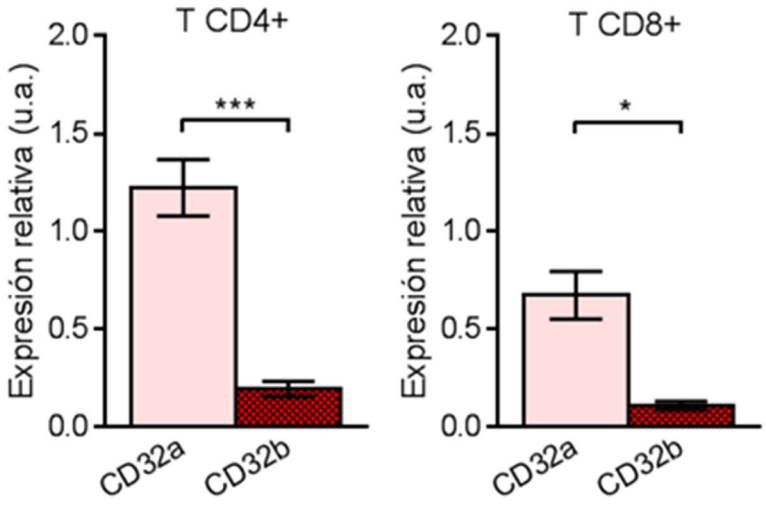


Figura 2: Las células T CD4+ y CD8+ de niños VSR+ (n=19) fueron aisladas por cell- sorting por citometría de flujo (pureza > 99%). Luego del análisis del mARN de las isoformas CD32a y CD32b por RT-qPCR, se determinó la expresión de CD32a y CD32b relativizada a un calibrador de referencia (monocitos) (7). Test de Wilcoxon (media±ESM).

Considerando que las células T de los niños son permisivas a la infección por VSR (8), luego analizamos si la presencia de CD32 podría permitir que los anticuerpos IgG faciliten la infección por VSR a través del mecanismo conocido como 'ADE' (Antibody-dependent enhancement) de la infección, fenómeno caracterizado en macrófagos y células NK (9). Para ello se hicieron ensayos de infección de células T purificadas de niños VSR+ empleando virus (cepa Long, subtipo A; MOI=1) previamente incubado con dosis subneutralizantes de inmunoglobulina humana intravenosa (IVIg), que contiene anticuerpos específicos para el VSR. Como se muestra en la **Figura 3**, las dosis subneutralizante de IVIg no potenció la infección de células T por VSR.

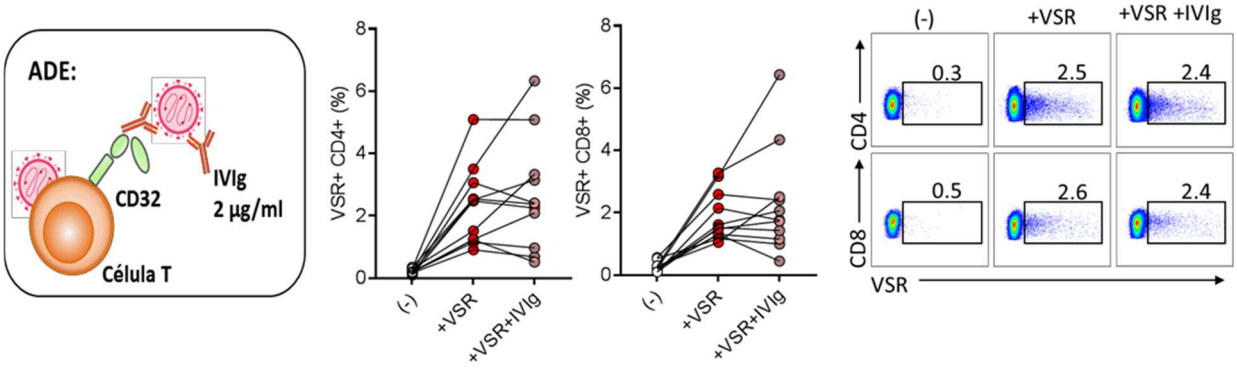


Figura 3: (a) Modelo de ADE de la infección por VSR en células T. La puesta a punto de este ensayo fue llevada a cabo en la línea monocítica THP-1 que expresa altos niveles de CD32 que facilitaron la infección. El stock viral fue generado sobre la línea celular HEp-2 y luego clarificado y concentrado por ultracentrifugación sobre colchón de sacarosa 20%. Células T de niños con VSR (n=11) purificadas por cell sorting, fueron estimuladas con PHA (4 µg/ml) por 24h. Para el ensayo de infección facilitada por anticuerpos (ADE), el VSR fue previamente acomplejado con dosis sub-neutralizante de anticuerpos (IVIg, 2 µg/ml). Luego las células fueron infectadas y cultivadas por 48h. Se evaluó el % de infección por VSR en células CD4+ (a) y CD8+ (b) por citometría de flujo. Test de Friedman. (c) Dot plot representativos.

Seguidamente, analizamos el efecto funcional de la estimulación del CD32 en las células T. Para ello, se indujo el crosslinking del receptor utilizando un anticuerpo de ratón anti-CD32 humano (clon IV.3, 30 µg/ml) seguido de la incubación de un anticuerpo Fab'2 anti-IgG de ratón (50 µg/ml, ver modelo en **Figura 4a**). Las células T CD4+ purificadas fueron cultivadas 3 días con Fitohemaglutinina (PHA, 4 µg/ml), y posteriormente se cuantificó la producción de citoquinas en el sobrenadante de dichos cultivos. Se observó que la unión del CD32 a su ligando aumentó significativamente la producción de IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-6 e IL-10 de las células T CD4+, pero disminuyó la producción de IL-17 (**Figura 4b**). Estas observaciones toman particular relevancia teniendo en cuenta que en estudios previos hemos demostrado que la producción de IL-2 por células T CD4+ se encuentra afectada durante la infección por VSR (10). En cuanto a las células T CD8+, el estímulo del CD32 indujo la degranulación de las células, medida como expresión de CD107a en la membrana celular luego de un breve estímulo con PMA/Ionomicina (**Figura 4c**). Estos resultados concuerdan con la

predominancia de la isoforma activadora CD32a observada en estas células.

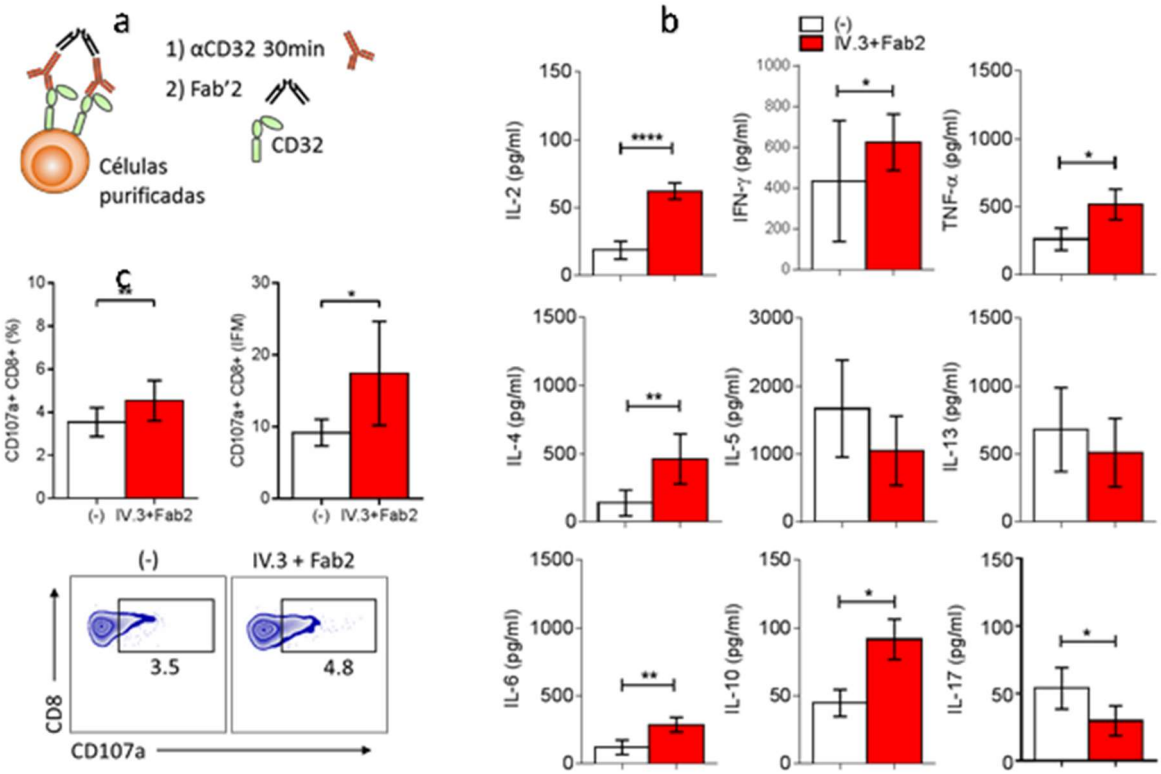


Figura 4: (a) Modelo de crosslinking del CD32, realizado incubando 1 hora con anti-CD32 clon IV.3 (30 µg/ml) + 30 minutos con Fab'2 anti-IgG de ratón 50 µg/ml. (b) Citoquinas cuantificadas por Legend Plex y ELISA en sobrenadante de cultivo de células T CD4+ purificadas y estimuladas o no con IV.3+Fab'2 y PHA por tres días. (c) Degranulación de células T CD8+ purificadas y estimuladas o no con IV.3+Fab'2 por 18h, luego de un estímulo corto con PMA/Ionomicina. Test de Wilcoxon, media±ESM; * $p<0.05$ ** $p<0.01$ **** $p<0.0001$.

Finalmente, debido a que los pacientes infectados con VSR mostraron una variación interindividual sustancial con respecto a la frecuencia de células T que expresan CD32, analizamos si ésta expresión estaba relacionada con el curso clínico de la infección. De hecho, encontramos que la frecuencia de las células T CD32+ CD4+ o CD32+ CD8+ se correlacionó negativamente con la gravedad de la enfermedad (**Figura 5**), lo que sugiere que la expresión de CD32 por las células T podría contribuir a la resolución adecuada de la infección por VSR.

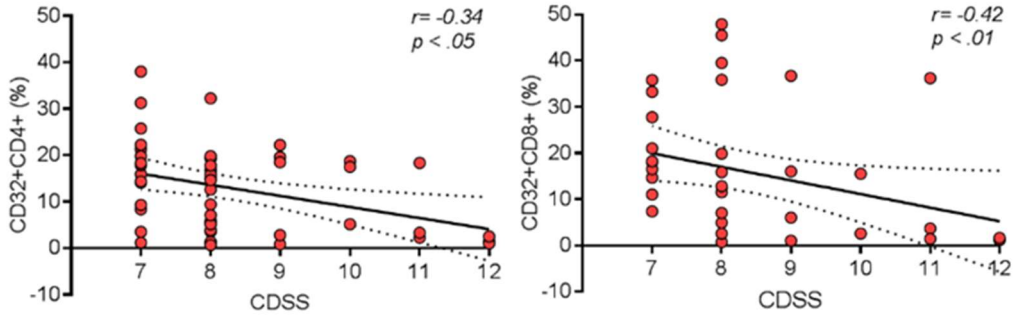


Figura 5: Correlación entre score clínico (CDSS) y % de células T CD4+CD32+ y CD8+CD32+ de niños VSR+, evaluada mediante coeficiente de correlación de Spearman (r).

Estos resultados muestran que durante la infección severa por VSR en los niños, la estimulación del CD32 pueden proporcionar una señal capaz de promover la activación de las células T que contribuye a la resolución de la infección. De esta manera, estos hallazgos sugieren un mecanismo novedoso a través del cual los anticuerpos IgG anti-RSV podrían modular la respuesta inmune contra la infección por VSR.

Los complejos inmunes que contienen IgG son los ligandos naturales de CD32. Los casos más graves de VSR ocurren en bebés menores de 6 meses que tienen cantidades considerables de anticuerpos IgG maternos capaces de interactuar con partículas virales que conducen a la formación de inmunocomplejos. Está ampliamente aceptado que los complejos inmunes desencadenan la activación de las células mieloides, así como la vía clásica del complemento, pero inhiben la activación de las células B. Recientemente, hemos informado de un defecto intrínseco en la función de las células T de los niños con VSR. Nuestros resultados actuales sugieren que durante la infección severa por VSR, los complejos inmunes podrían proporcionar una señal estimulante capaz de promover la activación de las células T que contribuyen a la resolución de la infección. Estos hallazgos sugieren un mecanismo novedoso a través del cual los anticuerpos IgG anti-VSR podrían modular tanto la respuesta inmune durante la infección natural por VSR como la inmunidad protectora proporcionada por la vacunación.

REFERENCIAS

1. Geoghegan, S., Erviti, A., Caballero, M.T., Vallone, F., Zanone, S.M., Losada, J.V., Bianchi, A., Acosta, P.L., Talarico, L.B., Ferretti, A., et al. 2017. Mortality due to Respiratory Syncytial Virus. Burden and Risk Factors. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 195:96-103.
2. Openshaw, P.J.M., Chiu, C., Culley, F.J., and Johansson, C. 2017. Protective and Harmful Immunity to RSV Infection. *Annu Rev Immunol* 35:501-532.
3. Mazur, N.I., Higgins, D., Nunes, M.C., Melero, J.A., Langedijk, A.C., Horsley, N., Buchholz, U.J., Openshaw, P.J., McLellan, J.S., Englund, J.A., et al. 2018. The respiratory syncytial virus vaccine landscape: lessons from the graveyard and promising candidates. *Lancet Infect Dis* 18:e295-e311.
4. Pincetic, A., Bournazos, S., DiLillo, D.J., Maamary, J., Wang, T.T., Dahan, R., Fiebiger, B.M., and Ravetch, J.V. 2014. Type I and type II Fc receptors regulate

innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 15:707-716.

5. van Erp, E.A., Luytjes, W., Ferwerda, G., and van Kasteren, P.B. 2019. Fc-Mediated Antibody Effector Functions During Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease. *Front Immunol* 10:548.
6. Chauhan, A.K. 2016. Human CD4(+) T-Cells: A Role for Low-Affinity Fc Receptors. *Front Immunol* 7:215.
7. Holgado, M.P., Sananez, I., Raiden, S., Geffner, J.R., and Arruvito, L. 2018. CD32 Ligation Promotes the Activation of CD4(+) T Cells. *Front Immunol* 9:2814.
8. Raiden, S., Sananez, I., Remes-Lenicov, F., Pandolfi, J., Romero, C., De Lillo, L., Ceballos, A., Geffner, J., and Arruvito, L. 2017. Respiratory Syncytial Virus
9. (RSV) Infects CD4+ T Cells: Frequency of Circulating CD4+ RSV+ T Cells as a Marker of Disease Severity in Young Children. *J Infect Dis* 215:1049-1058.
10. van Erp, E.A., Feyaerts, D., Duijst, M., Mulder, H.L., Wicht, O., Luytjes, W., Ferwerda, G., and van Kasteren, P.B. 2019. Respiratory Syncytial Virus Infects Primary Neonatal and Adult Natural Killer Cells and Affects Their Antiviral Effector Function. *J Infect Dis* 219:723-733.
11. Sananez, I., Raiden, S., Erra-Diaz, F., De Lillo, L., Holgado, M.P., Geffner, J., and Arruvito, L. 2018. Dampening of IL-2 Function in Infants With Severe Respiratory Syncytial Virus Disease. *J Infect Dis* 218:75-83.

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) infection is the major cause of severe respiratory disease in infants, immunocompromised and older adults. RSV infects virtually all children by 2-3 years of age, resulting in nearly 3 million hospitalizations and 100,000 in-hospital deaths annually, mostly in developing countries. There is no approved vaccine against RSV infection. Passive prophylaxis with the humanized anti-RSV antibody palivizumab, is the only available intervention licensed for the prevention of severe RSV disease in high-risk individuals. RSV-specific serum IgG antibodies are present in most children and adults, reflecting the universality of RSV infection throughout life. Neutralizing antibodies remain a commonly accepted measure of protective immunity in vaccine trials. However, IgG antibodies might influence the course of RSV disease not only by acting as neutralizing antibodies, but also by activating effector functions through the receptors for the Fc portion of IgG (FcγRs). These receptors are widely expressed in granulocytes, mononuclear phagocytes and B cells. Whether T cell express FcγRs is still controversial, but recent studies strongly suggest that a minor fraction of T cells expresses FcγRII (CD32). We here show that severe RSV infection in infants is associated with a marked upregulation of CD32 expression in T cells. Moreover, we found that CD32 ligation improves the activation of CD4+ and CD8+T cells from hospitalized infants. Our present results suggest that during severe RSV infection in infants, ICs might provide a stimulatory signal able to promote the activation of T cells contributing to the resolution of infection. These findings suggest a novel mechanism through which anti-RSV IgG antibodies might modulate both, the immune response during natural RSV infection and the protective immunity provided by vaccination.

ABORDAJE EPIDEMIOLÓGICO-SOCIOCULTURAL EN LA PERIFERIA DE POSADAS-MISIONES: SUFRIMIENTO SOCIOAMBIENTAL EN EL ASENTAMIENTO LOS OBREROS

Miguel Alejandro Avalos

Instituto de Estudios Sociales y Humanos
IESyH - CONICET - UNaM

INTRODUCCIÓN

La interconexión entre salud y condiciones de vida es un fenómeno inextricable que ha estado en el centro de la atención de numerosas agencias gubernamentales, organismos internacionales, sujetos y organizaciones sociales. Dicha interconexión da cuenta de que tanto la salud como la enfermedad, su atención y prevención son procesos profundamente sociales. Entre estos factores sociales, la pobreza emerge como un factor clave que afecta de manera desproporcionada a las poblaciones más marginadas y vulnerables en todo el mundo. A su vez, la mala salud puede perpetuar la pobreza, creando un ciclo que atrapa a individuos y comunidades en una espiral de desventaja. En este sentido, la antropología médica crítica, así como la epidemiología sociocultural reconocen que es necesario abordar "los problemas sanitarios en su multidimensionalidad y de sus condicionantes y determinantes reconocidos o por reconocerse", privilegiando la voz de los mismos actores (Martínez y De Haro, 2007, p. 15). En similar dirección se expresaba la Comisión de Determinantes Sociales en Salud de la OMS, al señalar la importancia de reconocer la interrelación condiciones de vida/salud –y el rol de los sujetos sociales en este reconocimiento– para establecer políticas públicas efectivas, basadas en la evidencia (OMS, 2009). Desde este enfoque, entonces, consideramos que es más que necesaria la inclusión de la experiencia de los sujetos y actores sociales intervinientes en la compresión de eventos de salud-enfermedad, especialmente en aquellos contextos atravesados por múltiples desigualdades.

En este informe presentamos los principales hallazgos de la investigación titulada: "Significaciones y acciones en torno a la salud-enfermedad entre los habitantes de asentamientos informales en Posadas. Perfil epidemiológico sociocultural de las familias residentes en Los Obreros". La misma contó con un financiamiento de la Fundación Alberto Roemmers (2019-2020), destinada a equipamiento e insumos. Es menester señalar que dicha investigación se encontraba subsumida dentro de otra más amplia financiada por el CONICET: "Hábitat y proceso de salud-enfermedad-atención/prevención entre pobladores de villas y asentamientos en la ciudad de Posadas, Argentina" [1], desarrollada entre los años 2017-2023, registrada en el RENIS SISA-IS002609 y aprobada por el Comité de Ética en Investigación Provincial.

[1] Dicha investigación culminó con la presentación de la tesis doctoral del autor, en el Programa de Posgrado en Antropología Social de la Universidad Nacional de Misiones en julio del 2023, titulada: Sostener la vida. Sufrimiento socioambiental y cuidados en el asentamiento Los Obreros de Posadas, Misiones-Argentina.

Desde un abordaje de tipo cualitativo-etnográfico, nuestro objetivo es describir las enfermedades y padecimientos más comunes en la población, situándolas en su contexto de producción. Finalmente, en nuestras conclusiones retomaremos la evidencia recopilada pensándola en términos de insumo para la toma de decisiones en salud pública. Por cuestiones éticas hemos cambiado el nombre tanto el nombre del asentamiento como los de nuestros interlocutores, garantizando así no solo la confidencialidad sino también su anonimización.

MATERIALES Y MÉTODO

El método utilizado en la investigación general consistió en la realización de entrevistas en profundidad y observación participante como procedimientos privilegiados, también se realizó un relevamiento por encuesta (Guber, 2016). Dichos datos obtenidos de primera mano fueron cruzados con fuentes secundarias (informes técnicos, líneas programáticas, etc.).

Los Obreros, fue ocupado y constituido inicialmente a mediados del 2013, al igual que otros tantos asentamientos recientes[2]. Este espacio se conformó con familias que provenían de otros asentamientos ubicados en contextos de revalorización y de consolidación (analizados en el capítulo anterior) como así también de los barrios construidos por la Entidad Binacional Yacyretá (Fátima o San Isidro) para las familias que fueron expulsadas del frente costero a raíz de la suba del embalse de la represa.

En este sentido, la dinámica demográfica de los asentamientos de procedencia, (la densificación, el crecimiento de las familias, el hacinamiento, la falta de espacio para construir, la búsqueda de independencia, etc.) fueron procesos que incidieron en la búsqueda de tierras para la conformación de asentamientos nuevos. Otro factor de desplazamiento ha sido la incidencia público-privada (Estado y mercado inmobiliario) sobre los mejores suelos urbanos, proceso a través del cual la legislación urbana los corre, los desplaza (Brites, 2019).

[2] La Organización de Naciones Unidas, en su capítulo específico sobre Hábitat, definió en el 2015 como asentamiento informal a aquellas áreas residenciales en las cuales: "1) los habitantes no ostentan derecho de tenencia sobre las tierras o viviendas en las que habitan, bajo las modalidades que van desde la ocupación ilegal de una vivienda hasta el alquiler informal; 2) los barrios suelen carecer de servicios básicos e infraestructura urbana, y 3) las viviendas podrían no cumplir con las regulaciones edilicias y de planificación y suelen estar ubicadas geográfica y ambientalmente en áreas peligrosas" (ONU-Hábitat, 2015, p. 2).



Mapa 1. Localización de Posadas en el mapa de Misiones. Fuente: Instituto Geográfico Nacional.

El trabajo de campo comenzó con una etapa exploratoria en el asentamiento a los fines de realizar un mapeo, asimismo realizamos una historización y caracterización de las condiciones del hábitat mediante una búsqueda bibliográfica específica (años 2017-2018). Atendiendo que en investigaciones como estas "el interés fundamental no es la medición, sino la comprensión de los fenómenos y los procesos sociales en toda su complejidad" (Martínez-Salgado, 2012, p. 615), luego de la fase exploratoria procedimos a tratar con las familias interesadas en participar de la investigación.

El muestreo fue aleatorio, tomando contacto con las unidades domésticas que participaban de actividades comunitarias del comedor ubicado en el asentamiento a los fines de entrevistarlos (años 2019-2020). Hemos considerado a las unidades domésticas como unidad de análisis y a las jefas de hogar como unidad de registro, reconociendo que estas tienen un rol significativo "en función de la importancia que tienen respecto del proceso de salud del grupo doméstico" (Menéndez, 2008). Debido a la adopción de un enfoque relacional (Menéndez, 2003), además de incluir a las jefas/es de familias residentes en el asentamiento, también entrevistamos a otros Informantes significativos (médicos, enfermeros, promotores de salud, miembros de ONGs y organizaciones eclesiales que trabajen con las familias residentes en los asentamientos, agentes municipales) que prestaron consentimiento para participar. La suficiencia de la muestra estuvo directamente relacionada con la saturación, entendiendo por saturación a ese momento en que "las informaciones se repiten, son redundantes y no aportan aspectos nuevos, constatándose el agotamiento de nuevos datos por parte de los diferentes participantes y de los diferentes contextos" (Vázquez, 2011, p. 71).



Mapa 2. Localización de los asentamientos ubicados en la zona de "expansión urbana en Posadas" (Brites, 2022), entre los cuales se encuentra Los Obreros. Fuente: elaboración propia en base a Google Earth.

Las investigaciones epidemiológicas socioculturales como ésta buscan entender cómo factores sociales, económicos, políticos y culturales configuran modos específicos de vivir, enfermar, sanar y/o morir. Dado que cada comunidad puede tener características únicas, la elección de Los Obreros como lugar de investigación nos posibilita una comprensión más profunda y específica de las dinámicas de salud y pobreza en este contexto particular, evitando generalizaciones excesivas y miradas homogeneizantes al respecto de espacios sociales como éste.

El proceso de trabajo de campo se vio interrumpido por la pandemia del virus SARS-COV-2 (COVID-19), cuando el gobierno nacional decretó la Emergencia Sanitaria y dispuso el Aislamiento Social Preventivo y Obligatorio (ASPO) mediante el decreto 297/20, en el mes de marzo del 2020. En este marco, durante la pandemia procedimos al análisis de los registros obtenidos anteriormente, identificando los padecimientos y enfermedades en las experiencias recabadas y profundizando en ciertas dimensiones analíticas tales como el sufrimiento socioambiental y el contexto.

DESARROLLO

Asentamientos y pobreza urbana.

La ciudad de Posadas, capital de la provincia de Misiones, desde hace varios decenios, se ve marcada por un cordón de asentamientos urbanos y periurbanos en los cuales se conjugan vulnerabilidad social, desocupación/ocupación intermitente y déficit en la calidad de vida de los sectores populares (Brites, 2019; González, Sintes y Báez, 2004). Numerosos procesos sociales –como crisis económicas en las zonas rurales, movimientos de migración interna y externa constantes, búsqueda de trabajo, de acceso a salud y educación, entre otros aspectos– hicieron que estos espacios llamados en otras épocas

“bolsones de pobreza”, “villas”, “asentamientos informales” y, actualmente, “barrios populares”, no solo se vieran cada vez más poblados, sino que se acrecentaran y se consolidaran en distintos espacios de la ciudad.

Hacia finales del año 2015 estos asentamientos se vieron inmersos –con la recreación de políticas de (re)corte neoliberal a nivel nacional– en una intensificación de la precarización de la vida, junto a la pérdida de numerosos derechos. En este sentido, estas experiencias han dado lugar a numerosas formas de sufrimiento, padecimientos, enfermedades y malestares con un fuerte impacto en sus cotidianidades (Avalos, 2020; Grimberg, 2017).

Desde el segundo semestre del 2017 y coincidiendo con el inicio del trabajo de campo en la periferia de Posadas, la pobreza pasó de afectar a un 29,7% de los posadeños/as al 41,3% de esa población, ya en el segundo semestre del 2019 (INDEC, 2019). En este contexto, Misiones ha pasado a ocupar el segundo lugar entre las provincias del NEA en términos de la cantidad de asentamientos, alcanzando un total de 240 en todo su territorio. En el caso específico de Posadas y su área conurbana, se han registrado 91 asentamientos (RENABAP, 2018). Algunos autores, como Kessler y Di Virgilio (2008) y Barreto (2018), sostienen que el crecimiento demográfico, junto con la falta de políticas gubernamentales que garanticen las condiciones mínimas de acceso a bienes, servicios e infraestructura en las ciudades, son los principales factores que han contribuido a la creación y persistencia de la denominada “ciudad informal”; la cual es, a su vez, producto y productora de múltiples desigualdades (Aguero y Perelman, 2019).

En el asentamiento Los Obreros, las primeras ocupaciones de tierras no se originaron exclusivamente con el propósito de buscar o crear un espacio habitacional es decir, no respondieron necesariamente a la búsqueda/generación de un espacio destinado a la vivienda. Más bien, el objetivo fue establecer un lugar donde llevar a cabo actividades productivas específicas, como la fabricación de ladrillos.



Fotografía 1. Olería. Fuente: archivo fotográfico de campo. Diciembre 2017.

En Los Obreros, al caminar por el asentamiento, nos encontrábamos con olerías y con numerosas familias dedicadas a esta actividad productiva. Una labor que necesita suelos específicos (arcillosos, fangosos y húmedos), es por ello, que pueden observarse numerosos estanques originados por la extracción de la tierra para la elaboración de los ladrillos.

Epidemiología sociocultural y sufrimientos.

En diversos estudios realizados en Posadas, desde el campo de la epidemiología y la salud pública, se hacen referencia de manera frecuente al "contexto", a los "factores socioeconómicos", a las "características socioculturales", a lo "social" o a los "hábitos culturales" de las personas que forman parte de los fenómenos analizados (Grenon, et al, 2014; Jacquier, et al, 1999; Jordá, et al, 2020; Malvasi, et al, 2022). Ahora bien, por los modos en que lo "social" es abordado, la forma en que son construidos los datos y las maneras en que éstos son puestos en juego en el análisis, quedan relegados en un plano secundario.

En este sentido, coincidimos con Breilh, quien señala que la salud humana y los ecosistemas son objetos que incluyen procesos de carácter biológico socialmente determinados… En el desarrollo de la salud de las sociedades humanas y de los ecosistemas con los que conviven, no hay espacios determinados por procesos puramente biológicos o naturales (Breilh, 2010, p. 100).

Adoptar esta perspectiva nos lleva a considerar que tanto la salud como la enfermedad, la atención y los cuidados, no pueden ser disociados de los contextos socioculturales, políticos y económicos en los que se producen. Ya que reconocerse como enfermo y ser reconocido como tal, así como el acceso –o no– a los recursos para atenderse y de las formas transaccionales de hacerlo (Menéndez, 2003), se desarrollan en este marco de posibilidades.

Desde las ciencias sociales, numerosos estudios locales dan cuenta de los malestares en distintos conjuntos poblacionales de la ciudad de Posadas, subsumidos dentro de temáticas más amplias, por ejemplo, del desarrollo y afectación por parte del proyecto hidroeléctrico de Yacyretá (Bartolomé, 1985; Brites, 2011; Jaume, Álvarez y Frías, 2010), de la pobreza urbana y la desigualdad (Gonzáles Villar, Baez y Sintes, 2004; Barone et al, 2018; Millán, Brites y Renoldi, 2021), y los modos de atención de las enfermedades en sectores pauperizados (Báez y Pini, 1983; Jaume *et al.,* 1983). No obstante, en dichos estudios los sufrimientos vinculados a la pobreza no han constituido *per se* un foco de análisis.

Sucede que, hasta fines del siglo XX el sufrimiento humano no ha sido un objeto de investigación sociológica o antropológica (Frank, 2001; Wilkinson, 2005). Esta omisión, indica Gouldner, se debe, a que la agenda socioantropológica –científica y académica– se distanció/ignoró el sufrimiento y su lenguaje con miras a la objetividad, la cual ha impulsado "una imagen del científico como vinculado a un reino superior…como serenamente por encima de las debilidades humanas y las pasiones distorsionadas o como poseedor de una imparcialidad sacerdotal" (1968, p. 116 traducción nuestra). Das (1995) y Bourdieu (2007 [1999]) coinciden en expresar que durante mucho tiempo se han silenciado o ignorado las experiencias relacionadas al sufrimiento en vínculo con las violencias, la marginalidad y la protesta social.

La temática del sufrimiento social, según autores como Kleinman (1988) y Delvecchio (1992), supone el esfuerzo por incorporar los aspectos culturales en la comprensión y el tratamiento del dolor desde un enfoque biomédico. Desde esta perspectiva los trabajos

antropológicos procedieron a diferenciar entre *illness*, *disease* y *sickness*. Mientras que *illness* designa a los padecimientos en tanto experiencias de las personas, entendidos y explicados por ellas; el término *disease* designa aquella entidad mórbida descrita por la autoridad biomédica, con sus síntomas y etiología. En tanto que el término *sickness* engloba el reconocimiento social del enfermo y los sentidos sociales otorgados a dicha experiencia (Conrad y Schneider, 1980; Fassin, 2004). Ahora bien, Castro Pérez (2009) argumenta que estas diferenciaciones son porosas y permeables, pues responden a "formas de nombrar lo que se vive… [siendo] el resultado de arreglos sociales específicos" (p. 22 corchetes nuestros).

La propuesta de Menéndez (2003) sobre las transacciones respecto de estos intercambios de saberes y apropiaciones de sentidos apunta a dar cuenta de esta interdiscursividad entre las formas de entender y atender los procesos de salud-enfermedad en los diferentes campos y niveles. En esta dirección, a los fines de nuestro trabajo, nos interesa retomar esta diferenciación antropológica (*illness*, *disease*, *sickness*) no como compartimentos estancos sino en su mutua implicación. Estas coordenadas analíticas requieren ser pensadas –tal como refiere Fassin (2004)– como objeto de competencias y luchas entre agentes –con diferente capacidad de incidencia– sobre las visiones y prácticas concernientes a la salud, y por consiguiente lo que deviene como problema de salud. Son estas cuestiones, entonces, las que deben ser aprehendidas no de manera abstracta, sino mediante los arreglos sociales concretos en las cuales tales dimensiones producen-reproducen.

Autores como Bourdieu y su equipo (2007) retoman la idea de sufrimiento social para interpretar los contextos de pobreza, los cambios socioeconómicos y la marginación urbana en Francia. Das (1995) y Scheper-Hughes (1997) también reflexionan desde esta concepción para examinar el sufrimiento relacionado con la guerra, la segregación, la muerte y la pobreza extrema en India y Brasil, respectivamente. En Argentina, los malestares y los padecimientos comenzaron a problematizarse en términos de sufrimiento social a partir de mapear los modos de vivir y significar esta cuestión por parte de los sujetos en diversos campos, tales como los consumos problemáticos (Epele 2012), las enfermedades crónicas como VIH (Grimberg, 2002 y Margulies 2014), los procesos de contaminación ambiental (Auyero y Swistum, 2008) y los vinculados a la economía informal en espacios urbanos (Carman, 2015). En estos trabajos se advierte un redireccionamiento en la recuperación de las configuraciones subjetivas del padecimiento, entendiendo el carácter performativo de dichas experiencias respecto de los distintos posicionamientos, las estrategias en juego y cursos de acción. Tal como define Grimberg (2003), la experiencia es: un proceso variable, situado en una trama de relaciones intersubjetivas, construido y reconstruido histórica y socialmente en una diversidad de dimensiones (cognitivas, normativo-valorativas, emotivas, etc.) Como unidad tensa entre acción y simbolización, la experiencia constituye la base de la construcción y el cambio de identificaciones y prácticas sociales, cuya comprensión requiere un contexto conceptual que articule las relaciones entre poder, cuerpo, género, sexualidad, emoción, reflexividad, en las distintas áreas de la vida cotidiana, ya que se trata de una activa construcción intersubjetiva, sujeta al mismo tiempo a procesos estructurales históricos (p. 81).

Tal y como hemos señalado, la temática del sufrimiento social fue progresivamente incluida en las agendas de investigación antropológica a partir de las últimas décadas del siglo XX (Epele y Guber, 2019). Las formas de vida configuradas por las desigualdades y las experiencias de sufrimiento irrumpieron en distintos espacios públicos interpelando a diversos actores sociales (agencias estatales, organizaciones sociales/no gubernamentales, instituciones confesionales, la academia) a fin de que puedan reconocerse y dimensionarse en su capacidad de afectación.

Desde esta perspectiva, podemos comprender que tanto el sufrimiento socioambiental como las formas singulares de cuidado que surgen en el asentamiento son componentes indisociables de una trama que conecta condiciones ambientales, relaciones sociales, políticas públicas y el mercado. En este entramado, las desigualdades económicas, socio-territoriales y de género se delinean en el día a día de las familias residentes en el asentamiento Los Obreros.

Vivir y enfermar.

En numerosos relatos y registros encontramos indicios de los vínculos entre los sufrimientos y los contextos en los que viven las familias del asentamiento. En relación con ello podemos discernir varios elementos referidos a aspectos del contexto, como el acceso a recursos, tales como el agua, a las imposibilidades de contar con una vivienda que abrigue y proteja, la cercanía a los estanques, entre otros; así como también a las relaciones y los vínculos sociales que se tejen tanto dentro del asentamiento como fuera de él: las relaciones entre vecinos o los vínculos laborales, que también gravitan en sus malestares.

Profundizamos en este apartado en lo que Castro Pérez (2009) denomina las "experiencias subjetivas de las causas de la enfermedad", es decir, en las teorías etiológicas que "son el medio por excelencia para analizar la manera en que los individuos interpretan sus padecimientos" (p. 37). Proponemos la categoría de sufrimiento socioambiental para dar cuenta de la integralidad de las experiencias humanas, que aluden a las formas particulares de malestares, padecimientos y enfermedades que se originan en contextos de degradación ambiental, de desigualdad y de segregación socioespacial. De esta manera, el sufrimiento socioambiental no se relaciona con una única causa sino que es el resultado de la conjunción de procesos sociales, políticos y económicos que afectan a las personas que habitan en este entorno históricamente determinado. Destacamos así el carácter antropogénico, histórico, social y cultural en la construcción del entorno o ambiente en cuestión, como también las experiencias vinculadas al sufrimiento y las diversas formas en que las desigualdades se hacen cuerpo en estos contextos.

Desde la reconstrucción de dos experiencias de vida en el asentamiento, abordamos las condiciones sociales, los vínculos y los sufrimientos que con ellas se relacionan.

Carmen.

En el 2018 Carmen vivía con su familia en el asentamiento desde hacía un año, aproximadamente. Cuando llegó, nos decía, *ya no había lugares cerca de las calles*. Esto hizo que tenga que instalarse en una zona más alejada, cercana a las olerías. En aquel momento Carmen tenía 35 años, seis hijos y un compañero. La mayor de sus hijas se encontraba embarazada, y vivía allí con su novio.

En una de las visitas nos compartió su preocupación, mencionando:

L*as moscas vienen de las basuras, de las cloacas, del agua estancada, y todo eso nos enferma… La colitis que tenían todos es por esa agua que tomamos, pero qué vamos a hacer…* (Conversación durante la visita domiciliaria. Registro de campo, agosto 2018). En el asentamiento, especialmente en las zonas cercanas a las olerías, se observaba una gran la presencia de insectos como moscas, mosquitos y cucarachas, los cuales a su vez son potenciales vectores de enfermedades como el dengue, diarreas y alergias, con especial incidencia entre las familias.

Aunque es cierto que la zona tiene dificultades para absorber rápidamente el agua debido a la calidad arcillosa del suelo (barro ñaú), los estanques son resultado de la extracción de dicha arcilla para la fabricación de ladrillos; y su contaminación se debe al llenado con residuos domiciliarios, que también se relaciona con la falta de contenedores y recolección municipal en la zona.

A su vez, la provisión de agua para el consumo de las familias se realiza a través de la red de agua corriente. Sin embargo, hemos observado que un número considerable de viviendas carece de instalación de agua y depende de las canillas públicas, mientras que, en otras viviendas, la instalación de agua llega únicamente hasta fuera de la vivienda. Es importante resaltar que el suministro de agua se realiza de manera precaria y expuesta mediante caños de polietileno –o a veces de PVC– que se conectan a la red. Esta situación insegura en la provisión de agua potable a menudo está relacionada con problemas en el aparato digestivo.

Paola, una de las mujeres que trabaja en el comedor, mencionó que desde hacía una semana muchas personas en el sector padecían de colitis:

Hace una semana que en este sector estamos todos con colitis. No es solo nosotros acá en casa… la de al lado también, y la del otro lado… todos. Mi sobrino es el que más sufrió en casa, porque es criatura y le dio con mucho dolor de estómago, pero viste que uno grande aguanta. Yo pienso que es del agua. Pero no podemos comprar agua a cada rato. Ahora estamos hirviendo el que es para tomar… (Registro de campo, junio 2018). Si bien es cierto que las características climatológicas de Misiones (cálido y húmedo) favorecen la transmisión de las enfermedades transmitidas por el agua (Berberian y Rosanova, 2012); estos padecimientos también se relacionan con la provisión de otros servicios domiciliarios (como el uso de letrinas y pozos sanitarios). Con respecto a esto último, según nuestro relevamiento realizado en el 2019 en el asentamiento mediante una encuesta, una de cada diez viviendas no contaba con baño instalado, y en otras éste se encontraba dispuesto fuera de las mismas. De las viviendas que tenían un baño instalado, la mayoría disponía de un desagüe hacia un pozo ciego o excavaciones en la tierra. En la siguiente imagen se puede apreciar cómo la manguera negra que proveía de agua para la casa de Carmen atravesaba uno de los estanques y el basural que lo circundaba.



Fotografía 2. Manguera para provisión de agua, atravesando un estanque. Fuente: archivo fotográfico de campo.

En cuanto a la cantidad de integrantes, la composición de los hogares en el asentamiento resultaba heterogénea (de 1 a 10 integrantes). En la encuesta realizada, se evidenció que la mitad de los hogares tienen cuatro o más integrantes. Este dato resulta coincidente con la media del total de miembros de los hogares del aglomerado Posadas (INDEC, 2019). Junto a estas condiciones debemos sumarle que el 61% de los hogares del asentamiento Los Obreros presentaba hacinamiento (más de dos personas compartían una habitación para dormir en promedio), y el 24% de los hogares evidenciaba hacinamiento crítico (más de 3 personas por habitación en promedio). *En esta piecita de tres por tres estamos nueve, se engripa uno y nos engripamos todos. Por más que nos cuidamos, el tema es cómo vivimos*, decía Carmen. Estos números se encontraban muy por encima de lo que se identificaba para el área de Posadas, donde los indicadores descendían al 14% y 4% de hogares afectados, respectivamente.

El hacinamiento no solo favorece el contagio de determinadas enfermedades, como daba cuenta Carmen, sino que también pueden relacionarse con otros malestares que no siempre eran explicitados abiertamente. Sobre esto decía Elizabeth, una referente comunitaria de Cáritas que solía visitar a Carmen:

*Yo le dije a Carmen que ponga por lo menos una cortina en el medio de la pieza y separe. Porque ahora están todos juntos ahí, sus cinco niños pequeños y la hija más grande que ya está embarazada. ¿Sabés qué pasa Miguel? Hay muchas cosas que no se dicen… Ella ahora no dijo nada, pero el otro día en el merendero sí me contó que se sentía mal estando todos encimados… Que ella entiende que su hija necesita más espacio, pero no da ahí dentro, por eso pelea también con la hija y el novio. Pero apenas pudo comprar un tambor grande para guardar agua con las changas que hace… tampoco tiene más espacio para hacer otra pieza (*Comentario de Elizabeth. Registro de campo, junio 2018).

Al igual que Carmen, muchas de las personas que viven en el asentamiento se encontraban trabajando en el sector informal. El 52% de la población en edad económicamente activa (entre 14 y 64 años) se empleaba en diversos rubros, siendo los más recurrentes el comercio (24%), la construcción (20%), la olería (15%) y el servicio doméstico (13%). El resto de los ocupados se desempeñaba en otras actividades de manera informal en

"changas" –trabajos pagos a destajo–. Se ha registrado un índice de desocupación del 19%, significativamente superior al 3% registrado en Posadas en el mismo período.

Débora.

Cuando conversábamos con Débora (23 años), nos decía:

Vine desde Eldorado [localidad ubicada al norte de Misiones]. Allá estábamos mal mismo, y un conocido de mi marido nos dijo para venir acá [al asentamiento]. Hace 5 meses recién llegamos, ya estaba embarazada. Ahora con mi panza grande así. Él enganchó con la CCC [Corriente Clasista y Combativa] para trabajar como barrendero en la cooperativa, y con la ayuda de Cáritas vamos llevando. Pero viste cómo estamos. Vamos a ver si podemos solucionar un poco esto. Ya hablamos con Carmela y sacamos fotos. Ella va a llevar en la delegación municipal para ver si pueden hacer algo, rellenar un poco el estanque y sacar la basura. Pero fijate como tengo los brazos, todo sarpullido –exhibe sus brazos–. *Y es de eso…* –señalando el estanque– *y cuando llueve tengo un miedo, porque entra todo en mi casa. No sé cómo vamos a hacer cuando nazca el bebé. Más cerca de la calle no es tan así, pero acá en el bajo casi todos estamos iguales. Ese estanque hace que todos acá estemos engripados. Las alergias de la gurisadas [niños] son porque van y se mojan en los estanques… si no es la alergia, es el agua* (conversación durante la visita domiciliaria. Registro de campo, junio 2018).

Aquellas afecciones a las que hacía referencia Débora, no se relacionaban solamente con los estanques, ya que las mismas eran registradas en todas las familias que residían en el asentamiento, aunque en las zonas cercanas a estos reservorios de agua estas afecciones eran más comunes. De este modo, las enfermedades respiratorias (gripes, asma, alergias), como así también aquellas que afectan a la piel (sarpullidos, escabiosis, dermatitis) estaban en especial vinculación con estas condiciones.



Fotografía 3. Casa de Débora junto a un estanque. Fuente: archivo fotográfico de campo.

En el asentamiento, la heterogeneidad en las viviendas era evidente. Un considerable número de familias residían en condiciones precarias, habitando casas construidas con paredes exteriores de madera, ya sea de tablas con o sin tapajuntas, y techos revestidos de

chapas de cartón. En algunas de estas viviendas, los pisos consistían en materiales como madera o ladrillo, mientras que, en otras, el suelo era de tierra. Estas deficientes y precarias condiciones de construcción exponían a las familias a la vulnerabilidad de las condiciones ambientales, como las inclemencias climáticas (frío en invierno, calor en verano, lluvias o granizo). Los altos niveles de humedad propiciaban la proliferación de hongos y ácaros, causando problemas de salud diversos. Además, la dificultad para mantener limpios los pisos favorecía la presencia de piques, pulgas y otros parásitos que provocaban diferentes afecciones como la sarna.

En la experiencia de Débora no solo encontrábamos el sarpullido, que lo exhibía –al mismo tiempo en que indicaba como problemático al estanque–, sino que también encontrábamos el miedo e incertidumbre por las crecidas y desborde del agua de los estanques. El saberse a merced de las condiciones climáticas, tornan más "temible" este sufrimiento por su carácter impredecible, difuso, disperso y poco claro (Hurtado, 2015).



Fotografía 4. Quema de residuos domiciliarios en la entrada del asentamiento. Fuente: archivo fotográfico de campo. Octubre 2018.

Otro de los problemas adversos del asentamiento que relató Débora, quien estaba sola en los momentos de las visitas, fue el del humo, tanto de los hornos de los ladrillos como de los residuos domiciliarios que los vecinos incineran en la calle o en sus mismos terrenos. Nos decía: *Yo no puedo respirar, le dijimos a la vecina que no queme más la basura ahí, pero le da igual. La última vez nos amenazó con un machete. Por las dudas no le dije más nada.* (Conversación durante la visita domiciliaria. Registro de campo, julio 2018).

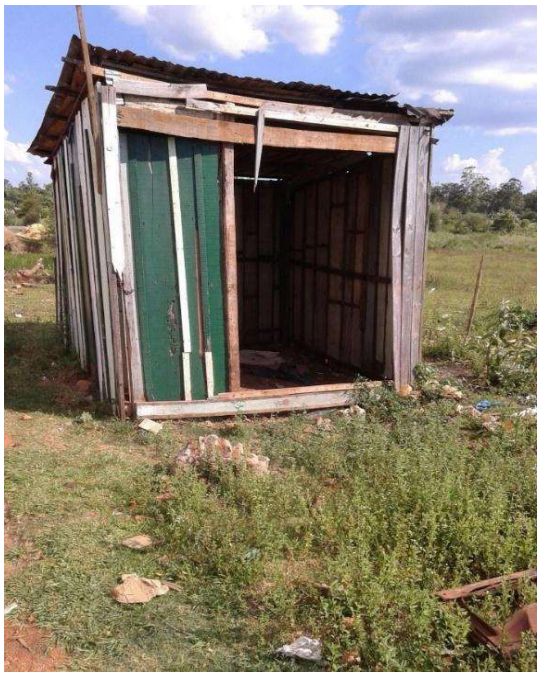
Una tarde, mientras conversábamos sobre los controles prenatales (ya que estaba embarazada), nos contaba que todavía no se había hecho el último control:

Me daba vergüenza ir al CAPS [Centro de Atención Primaria de la Salud] *porque siempre te preguntan dónde vivís, no podés anotarte si no le decís eso. Y cómo le digo que vivo en el pasillo o en la calle... una vergüenza… pero hasta para darte la leche del Hambre Cero* [Programa Provincial de Recuperación Nutricional Hambre Cero]. *Te hacen una ficha donde dice tu domicilio… algunos solo dicen el barrio.* (Conversación con Débora durante la visita domiciliaria. Registro de campo, julio 2018).

La sensación de vergüenza que experimentaba al intentar revelar su dirección, así como la dificultad para proporcionar una ubicación precisa que identifique una calle y número de casa, –en tanto su casa se encontraba instalada sobre un pasillo–, daba cuenta de su aflicción asociada a su sufrimiento. Una situación que puede entenderse como una manifestación de la violencia simbólica inherente a la experiencia del vivir el asentamiento y sentirse blanco de discriminación por parte de los agentes de salud.

Revelar dónde se vive, para muchas de las personas que residían en el asentamiento generaba un sentirse expuesta, que era acompañada de vergüenza, ansiedad y malestar emocional, por no *encajar* en las normas y expectativas sociales provocando una sensación de no pertenencia y de exclusión.

Al conjunto de estas adversidades, se le adicionaba la precariedad en lo laboral de su marido. En ese entonces, su esposo trabajaba en la cooperativa, como contraprestación del Plan Argentina Trabaja[3]. Tal inserción laboral fue fundamental para la llegada de la familia de Débora al asentamiento.



Fotografía 5. Casa en construcción, al fondo del asentamiento. Fuente: archivo fotográfico de campo. Diciembre 2019.

Cuando intentamos retomar el contacto con Débora no logramos dar con ella. Posteriormente nos enteramos de que semanas después del cierre de la cooperativa, su esposo falleció en medio de una gresca en el asentamiento y ella decidió volver a Eldorado. Las peleas entre vecinos suelen ser constantes en el asentamiento, y han sido varios los episodios contabilizados durante el trabajo de campo –4 casos registrados donde fallecieron varones–. De este modo, la violencia y la muerte dentro del

[3] Este programa fue lanzado en plena agudización de la crisis financiera internacional del 2008. El mismo consistió en promover la creación de cooperativas que llevasen adelante obras de mediana y baja complejidad con un fuerte impacto en los barrios (Fernández, 2012). Durante el gobierno de Cambiemos, dicho programa fue cerrado y reconducido hacia el nuevo programa Hacemos Futuro. No obstante, este viraje no implicó solamente un cambio de nombre, sino que implicó la "disolución de las cooperativas y en el establecimiento, a partir de 2018, de nuevas formas de contraprestación centradas en las capacitaciones individuales" (Pacífico, 2020, p. 184).

asentamiento también se configuran como formas de sufrimiento, con especial incidencia en la población masculina (Menéndez, 2008).

CONCLUSIONES

El análisis de las experiencias intersubjetivas relacionadas con diversos padecimientos nos llevó a desarrollar el concepto de "sufrimiento socioambiental". Este enfoque busca abordar estas experiencias, que se encuentran arraigadas en un contexto espacial y se entrelazan con adversidades multidimensionales. Para llegar a esta conceptualización, resultó fundamental entrecruzar los aportes provenientes del campo de la antropología médica crítica con investigaciones sobre la pobreza urbana. Este diálogo, derivado de dichas lecturas, nos permitió abordar las complejas realidades de segregación y precarización de la vida que caracterizan a Los Obreros. Estas condiciones no solo son el telón de fondo de las enfermedades y padecimientos que afectan a los residentes, sino que también influyen en cómo se experimenta, comprende y enfrenta el dolor y el malestar.
El sufrimiento socioambiental, incrustado en la vida cotidiana, se manifiesta en la intersección de diversos factores, como la habitabilidad del espacio, la falta de empleo estable, la sensación de violencia y abandono, la vulnerabilidad a la intemperie y la exposición a la discriminación. A través de las experiencias compartidas de pasar por momentos difíciles, que son reconstruidas a través de narrativas sobre padecimientos múltiples, buscamos establecer conexiones entre los significados individuales y el contexto más amplio en el que se insertan estas vivencias.

Desde la perspectiva de la epidemiología sociocultural, enfatizamos en la importancia de considerar cómo estas experiencias de sufrimiento son (re)construidas en procesos y contextos de interacción diversos y complejos. Esto permite analizar las experiencias de salud y enfermedad desde una perspectiva multidimensional que toma en cuenta tanto los factores individuales como los contextuales. En este sentido, resulta imperativo identificar las causas subyacentes de las disparidades en salud y orientar las políticas de salud pública en consecuencia. Reconocemos que la salud es un fenómeno multidimensional que va más allá de los aspectos médicos, y se considera cómo factores como la pobreza, la vivienda y la discriminación influyen de manera significativa en la salud de las personas, particularmente en las comunidades más vulnerables. Este enfoque ofrece una perspectiva más completa y contextualizada para abordar los desafíos de salud en comunidades como Los Obreros, lo que puede traducirse en políticas de salud pública más efectivas y adaptadas a las realidades socioculturales y ambientales específicas de estas poblaciones vulnerables.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguero, G. H., & Perelman, M. D. (2019). Desigualdad, imaginarios y escala urbana: un estudio comparativo de grupos subalternos en Salta y Buenos Aires, Argentina.
- Auyero, J., y Swistun, D. (2008). *Inflamable: Estudio del sufrimiento ambiental.* Buenos Aires, Paidós.
- Avalos, M. A. (2020). La salud como derecho y eje de protestas en Posadas, Misiones, Argentina. *Cuaderno urbano,* 29(29), 165-181.

- Barone, M. et al (2018) Asentamientos Populares y Desigualdades Sociales: Las Políticas públicas de urbanización en la Ciudad de Posadas, Misiones-Argentina. XXXVIII Encuentro De Geohistoria Regional (IIDTHH-CONICET-UNNE; IIDVI-FAU UNNE) Resistencia, Chaco.
- Barreto, M. (2018). El futuro (deseado) de los asentamientos precarios en América Latina. *Oculum Ensaios*, 15(3), 353-375.
- Bartolome, L. (1985). Estrategias adaptativas de los pobres urbanos: el efecto entrópico de la relocalización compulsiva. En: Bartolomé, L. (Comp.) *Relocalizados: antropología social de las poblaciones desplazadas.* Colección Hombre y Sociedad. Buenos Aires. IDES.
- Berberian, G., & Rosanova, M. T. (2012). Impacto del cambio climático en las enfermedades infecciosas. *Archivos argentinos de pediatría*, 110(1), 39-45.
- Bourdieu, P. (2007). *La miseria del mundo*. Buenos Aires. Fondo de Cultura Económica.
- Breilh, J. (2010). La epidemiología crítica: una nueva forma de mirar la salud en el espacio urbano. *Salud colectiva*, 6, 83-101.
- Brites, W. (2011) El lado oscuro de la relocalización: aislamiento, segregación y procesos embrionarios de acción colectiva en un conjunto habitacional. En: Báez, A. y Jaume, F. (Comp.) *Desarrollo y ciudadanía en Misiones, Argentina. Escenarios locales y procesos políticos.* Universidad Nacional de Misiones.
- Brites, W. (2019). *Ciudades, teorías e investigación urbana: una aproximación a los procesos urbanos de Posadas y Encarnación*. Ediciones CICCUS.
- Brites, W. (2022). Asentamientos Y Hábitat El Rol Condicionante Del Espacio Urbano En Posadas, Argentina. *Urbano* (Concepción), 25(45), 30-41.
- Carman, M. (2015). Una larga conversación ambiental: las narrativas del padecimiento en una política de relocalización. *O Social em Questão*, (33), 123-151.
- Castro Pérez, R. (2009). Salud y cotidianidad: un análisis hermenéutico. En: Grimberg, M. (Comp.) *Experiencias y narrativas de padecimientos cotidianos. Miradas antropológicas sobre la salud, la enfermedad y el dolor crónico.* Buenos Aires, Antropofagia.
- Conrad, P. y J. Schneider (1980), *Deviance and medicalization: From badness to sickness,* Saint Louis, C. V. Mosby.
- Das, V. (1995) *Critical Events: An Anthropological Perspective on Contemporary India,* Delhi: Oxford University Press.
- Delvecchio Good, M., Brodwin, P. E., Good, B. J. and Kleinman, A. (1992) *Pain as Human Experience: An Anthropological Perspective.* Berkeley: University of California Press.
- Epele, M. (2012). Sobre o cuidado de outros em contextos de pobreza, uso de drogas e marginalização. *Mana*, 18, 247-268.
- Farmer, P. (2000). Desigualdades sociales y enfermedades infecciosas emergentes. *Papeles de población*, 6(23), 181-201.

- Fassin, D. (2004). Entre las políticas de lo viviente y las políticas de la vida. Hacia una antropología de la salud. *Revista colombiana de antropología*, 40, 283-318.
- Fassin, D. (2016) *La razón humanitaria. Una historia moral del tiempo presente.* Buenos Aires. Prometeo.
- Fernández, J. P. (2012). La implementación del Programa Ingreso Social con Trabajo "Argentina Trabaja" en ámbitos subnacionales*. Documento de trabajo*, 96.
- Frank, A. (2001) 'Can we Research Suffering?', *Qualitative Health Research*, 11(3): 353-62.
- González Villar, C., Sintes, L. y Báez, A. (2004). *La constitución de la pobreza regional*. Posadas, Editorial Universitaria UNaM.
- Gouldner, A. (1968) 'The Sociologist as Partisan: Sociology and the Welfare State', *The American Sociologist*, 3:103-116.
- Grenón, S. L., Grabulosa, M. C. S., Regueira, M. M., Fossati, M. S., & von Specht, M. H. (2014). Meningitis neumocócica en niños menores de 15 años. Dieciséis años de vigilancia epidemiológica en Misiones, Argentina. *Revista argentina de microbiología,* 46(1), 14-23.
- Grimberg, M. (2002). VIH-Sida, vida cotidiana y experiencia subjetiva. Una revisión conceptual de las dimensiones de vivir con VIH. *Cuadernos Médico Sociales*, 82, 43-59.
- Grimberg, M. (2009). Sexualidad, experiencias corporales y género: un estudio etnográfico entre personas viviendo con VIH en el Área Metropolitana de Buenos Aires, Argentina. *Cadernos de Saúde Pública*, 25, 133-141.
- Grimberg, M. (2017). Resistencia, movilización y militancia: Tensiones y reconfiguraciones de la vida cotidiana. *Revista Brasileira de Ciências Sociais*, 32. 1-14.
- Hersch Martínez, P., & Haro, J. (2007). ¿Epidemiología Sociocultural o Antropología Médica? Algunos ejes para un debate interdisciplinar. Presentación en el *VI Coloquio de REDAM: Etnografías y Técnicas Cualitativas en Investigación Sociosanitaria.* Tarragona, Catalunya, Spain.
- INDEC (2019) Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, Encuesta permanente de Hogares.
- Jacquier, N., Dos Santos, L., Deschutter, J. D., Duarte, B., Rodriguez Fermepin, M., Martinelli, M., & de Torres, R. A. (1999). Sífilis en madres adolescentes en la ciudad de Posadas, provincia de Misiones. *Medicina* (B Aires), 59(5 Pt 1), 437-45.
- Jaume, F. G., Álvarez, N. C., & Frías, L. V. (2010). " Ríos libres para un pueblo sano". La relocalización de los vecinos en El Brete. Posadas, Misiones. *Cuaderno urbano: espacio, cultura y sociedad,* (9), 91-109.
- Jaume, F., Hedman, M., Niella, G., Schiavoni, G. y Schiavoni, L. (1983) *Estudio antropológico sobre salud y enfermedad en dos barrios de la ciudad de Posadas.* Instituto de Investigación. Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales. UNaM.
- Jordá G B, Ramos J M, Mosmann J, Lopez M L, Wegert A, Cuffini C. Prevalence of human papillomavirus and associated risk factors in women affiliated with state health

insurance in Posadas, Misiones (Argentina). *Rev Chilena Infectol* 2020; 37: 111-6. doi: 10.4067/s0716- 10182020000200111.

- Kessler, G., y Di Virgilio, M. (2008). La nueva pobreza urbana: dinámica global, regional y argentina en las últimas dos décadas. *Revista de la CEPAL*.
- Kleinman, A. (1988) The Illness Narratives: Suffering, Healing and the Human Condition (New York: Basic Books).
- Malvasi, G. N., Deschutter, E. J., Viudes, S. G., Ramos Rincón, J. M., & Zacharzewski, C. L. (2022). Encuesta social y de seroprevalencia de sífilis y HIV en adolescentes escolarizados en áreas vulnerables del Departamento Capital, Misiones, Argentina. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 56(2), 161-170.
- Margulies, S. (2014) *La atención del VIH Sida. Un estudio de antropología de la medicina.* Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Editorial de la Facultad de Filosofa y Letras Universidad de Buenos Aires.
- Martínez-Salgado, C. (2012). El muestreo en investigación cualitativa: principios básicos y algunas controversias. *Ciência & saúde coletiva*, 17, 613-619.
- Menéndez, E. (1994) "La enfermedad y la curación. ¿Qué es medicina tradicional?" *Alteridades*, 4 (7), 71-83.
- Menéndez, E. (2003). Modelos de atención de los padecimientos: de exclusiones teóricas y articulaciones prácticas. *Ciência & saúde coletiva*, 8, 185-207.
- Menéndez, E. (2008). Epidemiología sociocultural: propuestas y posibilidades. *Región y sociedad*, 20(SPE2), 5-50.
- Millan, M., Brites, W., y Renoldi, B. (2021) Relatos mediáticos y desigualdades urbanas en Posadas, Misiones. Notas para una discusión. En: Di Virgilio, M. y Perelman, M. (Comp.) *Desigualdad urbanas en tiempos de crisis*. Ed. UNL.
- OMS (2009). *Comisión sobre Determinantes Sociales de la Salud: informe de la Secretarí*a (No. A62/9). Organización Mundial de la Salud.
- ONU-Hábitat (2015). *Documento temático sobre asentamientos informales.* Nueva York. Disponible en: https://habitat3.org/wp-content/uploads/Issue-Paper-22_ASENTAMIENTOS-INFORMALES-SP.pdf.
- Pacífico, F. (2020) Del Argentina Trabaja al Hacemos Futuro: Apuntes etnográficos para pensar la transformación de los programas sociales desde la experiencia de organizaciones de la economía popular (2016-2018). *Estado y Políticas Públicas*. 8 (15) 165-189.
- Pini, C., y Báez, L. (1984). *Las enfermedades diagnóstico, tratamiento y curación de dos barrios de la ciudad de Posadas*. Informe de Investigación. Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales. UNaM.
- RENABAP (2018) Base de datos del Registro Nacional de Barrios Populares. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/desarrollosocial/renabap.
- Scheper–Hughes, N. (1997*). La muerte sin llanto: violencia y vida cotidiana en Brasil* Barcelona: Editorial Ariel.
- Vásquez, L. (2011). *Introducción a las técnicas cualitativas de investigación aplicadas en salud*. Universidad del Valle.

– Wilkinson, I. (2005) *Suffering. A Sociological Introduction*. Cambridge: Polity Press.

ABSTRACT

Introduction: We analyze the relationship between health and living conditions, focusing on the Los Obreros settlement. Our objective is to describe the most common diseases and illnesses in the population, placing them in their production context. From critical medical anthropology we recognize that health and illness are intrinsically social processes, and that poverty plays a crucial role in disproportionately affecting the most vulnerable populations around the world. Furthermore, poor health can perpetuate poverty, creating a harmful cycle for individuals and communities.

Method: From a qualitative-ethnographic approach, we conducted in-depth interviews, participant observation and surveys (2017-2020). Sampling was random, and domestic units and heads of household were considered units of analysis and registration, respectively. The COVID-19 pandemic affected the research, implying the completion of field work.

Results and discussions: From the records obtained, we introduce the concept of "socio-environmental suffering", with which we seek to understand the experiences of the residents of Los Obreros in relation to various diseases. These have their roots in a spatial context, intertwined with multidimensional adversities: allergies, flu, bronchospasms, colitis, violent deaths and alcoholism, depression, and shame, among others. These sufferings manifest themselves at the intersection of several factors, such as the quality of housing, the lack of stable employment, the perception of violence and state abandonment, the climate and discrimination.

Conclusions: From sociocultural epidemiology, we emphasize the importance of considering how these experiences of suffering are constructed and reconstructed in complex interaction processes and contexts, going beyond medical aspects. Finally, we highlight the need to identify the underlying causes of health disparities and guide public health policies in ways that adequately address the specific sociocultural and environmental realities of vulnerable populations.

COMPARACIÓN DE DOS PUNTAJES DE RIESGO DE COLESTEROL LDL ELEVADO CON HERENCIA POLIGÉNICA EN CASOS DE NUESTRA POBLACIÓN CON FENOTIPO DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR CON Y SIN VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS

Virginia Bañares [1], Graciela López [2], Javier Martini [1]

[1] Centro Nacional de Genética Médica, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud Dr. Carlos Malbrán. [2] Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Bioquímica Clínica, Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis

INTRODUCCIÓN

La Hipercolesterolemia Familiar (HF) es una enfermedad hereditaria con alto riesgo de Enfermedad Cardiovascular Aterosclerótica (ECA) precoz, que afecta aproximadamente 1/300 individuos, en su forma heterocigota. Su evolución es silenciosa, cursa con niveles elevados de colesterol plasmático, acarreado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y suele presentarse con un evento cardiovascular en la cuarta o quinta década de la vida, en ausencia de tratamiento adecuado. Los signos clínicos como xantomas tendinosos aparecen en menos de un 30% de los casos, y en forma tardía, por lo tanto, su identificación inequívoca suele ser dificultosa.

El origen genético de la HF se debe a mutaciones en 3 genes principales involucrados en el catabolismo de las LDL: el receptor de las LDL (RLDL), la apoproteína B (APOB) y la convertasa de proteínas subtilisina/kexina 9 (PCSK9). El estudio genético permite la identificación temprana de la HF, particularmente al aplicar el estudio en cascada familiar con el fin de identificar portadores en estadios iniciales, incluso preclínicos, y prevenir los eventos cardiovasculares mediante un tratamiento precoz, remarcando que mientras antes se inicie este último, menor es la posibilidad de desarrollar enfermedad coronaria.

En un 50% de los casos con diagnóstico clínico (6 o más puntos en el puntaje de DCLN), no se observan mutaciones. Esto se explica en parte porque algunos casos tendrían un origen poligénico de la hipercolesterolemia. En este sentido se postularon recientemente dos cálculos de puntajes de riesgo genético (GRS); uno compuesto por 10 snp (GRS-C o *score* canadiense) en Canadá (Wang et al, 2016), y otro de 6 snp (GRS-E, o s*core* europeo) en Europa (Futema el al, 2015). El puntaje GRS canadiense en su población de origen planteó que el 13% de los casos con hipercolesterolemia severa tenían un valor por encima del percentilo 90º, mientras que en un estudio previo nuestro, en la muestra estudiada alcanzó un 6,2%. En este trabajo, vamos a aplicar el GRS europeo en el mismo grupo de pacientes en los que ya evaluamos los genes clásicos antes mencionados, otros genes candidatos y el GRS canadiense, con el fin de comparar ambos *scores,* y también vamos a determinar (a partir de un grupo pequeño de controles) un valor de corte preliminar del GRS europeo para nuestra población.

POBLACIÓN DE ESTUDIO, MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio.

69 muestras de ADN de pacientes mayores de 18 años con diagnóstico clínico ¨posible¨ o ¨definitivo¨ (valores 6-8 y >8 respectivamente) de Hipercolesterolemia Familiar aplicando criterios de la ¨*Dutch Lipid Clinic*¨, que fueron evaluados clínica, bioquímica y genéticamente en el ¨Primer estudio de prevalencia de Hipercolesterolemia Familiar en la Argentina. Implementación de un modelo de detección en la zona sureste de la Provincia de Buenos Aires¨, dirigido por los Dres. L. Schreier y P. Corral, aprobado por la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, Res CD 4705/14, actualización Res CD 1762/17). Los estudios genéticos realizados previamente en este grupo fueron la secuenciación de los genes clásicos asociados a HF: LDLR, APOB, PCSK9, LDLRAP1 y otros como APOE, LIPA, ABCG5/8, CYP27A1, LIP, LIPC, y también se evaluó el GRS-C como describieron *Wang y col.* **tabla 1**. 21 (32%) con variantes genéticas en: LDLR (n=18, 27%) y APOB (n=3, 5%).

Muestras de ADN de los controles.

Se recolectaron 27 muestras de sangre para controles (individuos con lípidos en valores normales que no consumían estatinas), en todos los casos se obtuvo el consentimiento informado y se les explicó el trabajo. Se extrajo el ADN con la técnica salina. De los 27 ADNs, 1 resultó no amplificable.

Determinación del GRS-E.

Los 6 SNP que integran el *score* se determinaron con secuenciación de Sanger. Se diseñaron 5 juegos de *primers* para cubrir los 6 loci, cuya descripción se resume en la **tabla 2**. Se utilizaron los programas *Primer 3* y *Primer 3 Plus (*http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/ y https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi). En todos los casos se chequearon con los programas BLAST https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi y UCSC *in–silico* PCR, https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr, con el fin de evaluar su especificidad.

El cálculo del valor del *score* se realizó como lo describieron *Futema y col*, el valor de corte planteado para poblaciones de origen caucásico propuesto es mayor a 0.76.

Tabla 2: Descripción de los primers de los 6 SNP del GRS-europeo.

rs	Gen	Tipo de variante y ubicación		Primer F	Primer R	T de annealing	Tamaño seg, bp
rs629301	*CELSR2*	utr variant	3´no cod.	GGAGGACAGGGTACCACACA	GCAATTCCTGCAAAGGGTTA	56	284
rs1367117	*APOB*	missense	Exon 4	AGTAATTCCCTGATCCACGATG	GTGTTCCCAGCACCATTCC	56	392
rs6544713	*ABCG8*	intron variant	Intron 4	CAGACTCCTCCAGCCATGAG	CCCCTTTCAGCTCAGACATT	53	226
rs6511720	*LDLR*	intron variant	Intron 1	ACCGGGGATGATGATGATT	GAGGAAAACATCAGGGGTGT	58	233
rs429358	*APOE*	missense	Exon 4	TCGGAACTGGAGGAACAACT	GCTCCTTCACCTCGTCCAG	58	481
rs7412		missense	Exon 4			56	

Los genotipos de los snp de los loci rs1367117, rs6544713, rs6511720, rs429358 y rs7412 de los pacientes con estudio genómico previamente realizado por NGS se realizó a partir

de los archivos VCF (*variant calling format*). El locus rs629301 CELSR2 no fue cubierto por los *reads* del panel previamente utilizado, por lo que se lo evaluó con secuenciación de Sanger. En 66 casos se pudo obtener el valor del *score* del GRS-europeo. El cálculo del GRS-Europeo se realizó como lo reportaron sus autores Tabla 3.

Tabla 1: Descripción del GRS-Canadiense.

GRS-C*			
Cr.	Posición (GRCh37)	rsID	Gen
1	55496039	rs11206510	PCSK9
1	109817590	rs12740374	CELSR2
2	21286057	rs515135	APOB
2	44073881	rs6544713	ABCG8
5	74655726	rs3846663	HMGCR
5	156398169	rs1501908	TIMD4
12	121388962	rs2650000	HNF1A
19	11202306	rs6511720	LDLR
19	19407718	rs10401969	NCAN
20	39228784	rs6102059	MAFB

*valor de corte ≥1,96 (Wang et al.).)
Cr: cromosoma; rs: número de rs dbSNP

Tabla 3: Descripción de GRS-Europeo

GRS-E*			
Cr.	Posición (GRCh37)	rsID	Gen
1	109818306	rs629301	CELSR2
2	21263900	rs1367117	APOB
2	44072576	rs4299376	ABCG8
19	11202306	rs6511720	LDLR
19	45411941	rs429358	APOE
19	45412079	rs7412	APOE

*valor de corte >0,76 (Futema et al.)
Cr: cromosoma; rs: número de rs dbSNP

Análisis estadístico.

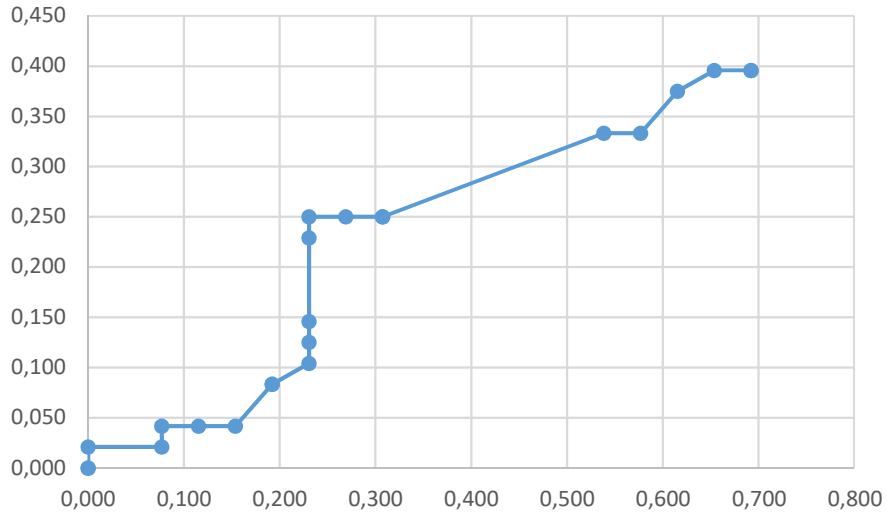
Se comparó la coincidencia entre ambos GRS con la prueba de chi2, y los niveles de c-LDL y el puntaje de DLCN entre cada GRS positivo y negativo con las formas monogénicas (variantes en genes clásicos) con la prueba de ANOVA. La sensibilidad y especificidad de los GRS en la muestra se evaluaron con curvas ROC, considerando a los individuos con variantes LP o P como controles (software SPSS 25.0). Las curvas se compararon entre sí usando la prueba de comparación de curvas ROC (software STATA SE 13, *De Long et al.*). El valor de corte para el GRS-E se determinó con una curva ROC entre casos y controles aplicando el programa Excel.

RESULTADOS

Determinación preliminar del valor de corte del GRS-E en nuestra población.

El GRS-E en el grupo de controles mostró que 8/26 tenían valores superiores 0,76. La aplicación de la curva ROC entre los 26 controles y 48 casos sin variantes genéticas P o LP en alguno de los genes clásicos, así se excluyeron aquellos casos con origen monogénico de sus valores elevados de c-ldl. El valor de corte obtenido fue, mayor a 0.785, sensibilidad 0,231 y especificidad 0,250, **Figura 1**.

Figura 1: Curva ROC para GRS europeo entre casos y controles .



Comparación de la proporción de casos con herencia poligénica detectada por ambos puntajes.

El GRS-C de 10 snp fue positivo en 14/66 (21%) casos (datos previos), y el GRS-E, 6 snp, resultó positivo en 23/66 casos (35%), el test de chi2 mostró que estas diferencias son estadísticamente significativas, p=0,003.

Similitudes y discrepancias de ambos puntajes en la muestra de pacientes.

En 49 casos ambos GRS fueron coincidentes: ambos positivos en 10 casos (15%) y ambos negativos en 39 (59%). En la **Tabla 4** se resumen los resultados.

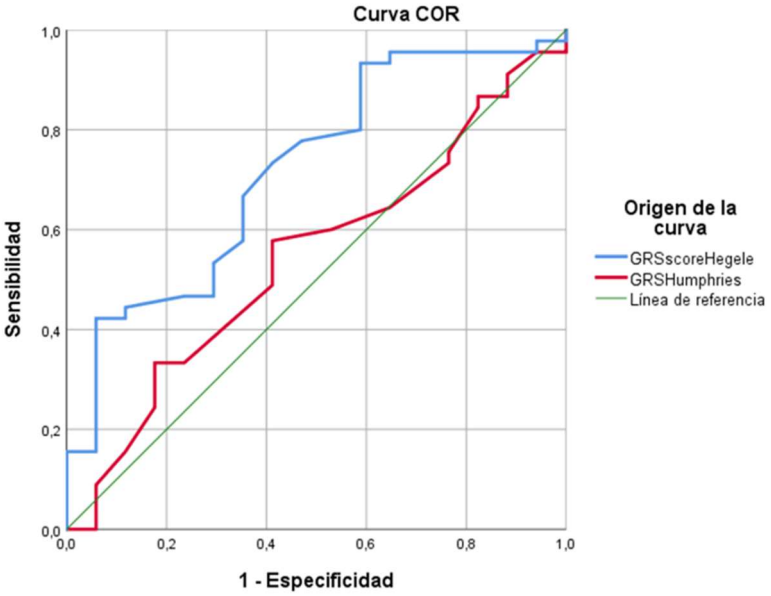
Tabla 4: Resultados de los GRS-Canadiense y GRS-Europeo.

		GRS-E		Total
		-	+	
GRS-C	-	39 (59%)	13 (20%)	52 (79%)
	+	4 (6%)	10 (15%)	14 (21%)
Total		43 (65%)	23 (35%)	66 (100%)

De los 4 casos, GRS-C positivo y GRS-E negativo, 3 tenían valores de puntaje del score europeo coincidente con el punto de corte de poblaciones europeas (0,76). Para ser positivo el resultado debe ser mayor a 0.76. Si consideramos el valor preliminar obtenido para nuestra población, 0,785, los resultados son los mismos.

Los resultados de las curvas ROC para los GRS-C y GRS-E se muestran en las Figura 2 y Tabla 5, el test de chi2 mostró que las diferencias son significativas, p=0,01.

Figura 2: Curvas ROC de los puntajes poligénicos GRS-Canadiense y GRS-Europeo



Comparación de curvas ROC: p=0,01.

Tabla 5. Análisis de las curvas ROC

	S	E	ABC	IC 95%
GRS-C	20%	94%	0,72	0,58-0,86
GRS-E	33%	76%	0,54	0,38-0,70

GRS-C: canadiense; GRS-E, europeo; S: sensibilidad; E: especificidad; ABC: área bajo la curva; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

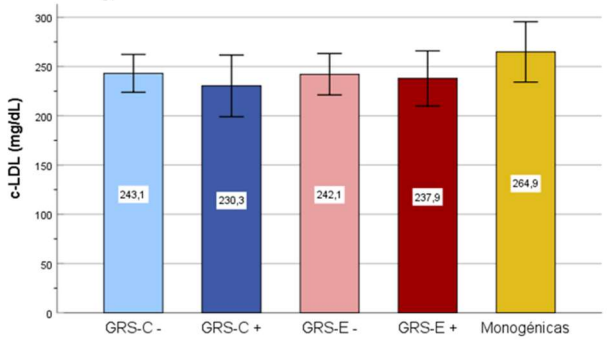
Niveles de colesterol y GRSs.

Los valores medios de colesterol ldl para los casos con GRS-E positivo y negativo fueron semejantes. Lo mismo en relación al GRS-C. Las formas monogénicas presentaron mayor nivel de c-ldl. Pero el test de ANOVA mostró no hay diferencias significativas, p=0.49, Figura 3.

***Score* clínico y GRSs.**

El *score* clínico (puntaje DLCN) también fue semejante al agrupar según los resultados de los GRS. Las formas monogénicas mostraron valores significativamente mayores, test de ANOVA p=0.03 respecto del GRS-E negativo, y respecto del GRS-C negativo p=0.03. Sin embargo, las diferencias entre los GRS positivo y las formas monogénicas no alcanzan la significancia. Los datos están resumidos en la Figura 4.

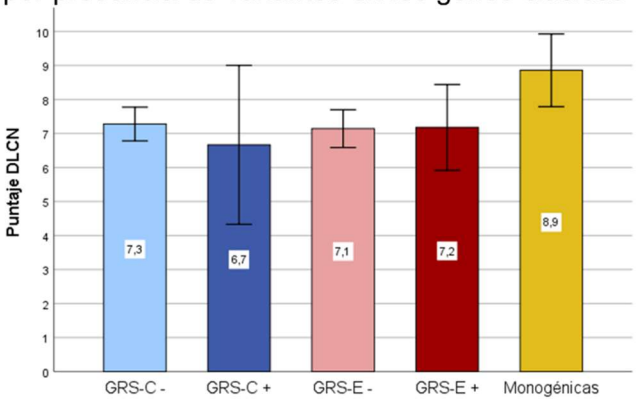
Figura 3: Valores medios de colesterol de LDL agrupando por GRS y por presencia de variantes en los genes clásicos



ANOVA: p=0,49

c-LDL: colesterol LDL; GRS-C: puntaje de riesgo genético canadiense; GRS-E: puntaje de riesgo genético europeo.

Figura 4: Valores medios de puntaje clínico DLCN agrupando por GRS y por presencia de variantes en los genes clásicos



ANOVA/Tukey: p=0,01
Monogénicas vs GRS-C negativo: p=0,03
Monogénicas vs GRS-E negaitvo: p=0,03

DLCN: puntaje de la Dutch Lipid Clinic Network; GRS-C: puntaje de riesgo genético canadiense; GRS-E: puntaje de riesgo genético europeo.

DISCUSIÓN

En la muestra analizada no se encontraron diferencias significativas en los valores de c-LDL entre las muestras con GRS positivo, GRS negativo y con variantes en genes clásicos. EL puntaje DLCN fue mayor en las muestras con variantes en genes clásicos que en las que tenían cualquiera de los dos GRS negativo, pero no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las monogénicas y las que tenían cualquiera de los dos GRS positivos, ni entre los GRS positivos y negativos.

Ambos GRS presentaron gran coincidencia en el grupo estudiado. El GRS-C mostró una mayor especificidad, pero ambos podrían contribuir en la detección de hipercolesterolemias de origen poligénico en nuestra población.

El valor de corte del GRS-E obtenido a partir de un pequeño grupo de muestras de individuos con perfil lipídico normal (sin consumo de estatinas) de nuestra población resultó similar al propuesto para la población caucásica europea, 0.785 y 0,76 respectivamente, los resultados con ambos valores de corte son los mismos en este estudio. Resta replicar este valor en una muestra de controles de mayor tamaño.

RESUMEN

La hipercolesterolemia severa, colesterol LDL>190 mg/dl, puede ser de origen monogénico o poligénico. En aproximadamente 50% de los casos de hipercolesterolemias

severas con fenotipo de Hipercolesterolemia Familiar (HF) se observan variantes en heterocigosis en los genes LDLR, APOB o PCSK9, con un patrón de herencia codominante, confirmando el diagnóstico de HF. Aquellos casos sin mutaciones se considerarían de origen poligénico y los puntajes de riesgo genético (GRS) son una herramienta propuesta para evaluar esta condición. Un GRS de 10 SNP se aplicó en la población canadiense (GRS-C); y otro de 6 SNP en la europea (GRS-E). Objetivo: comparar la capacidad discriminativa de estos dos GRS en pacientes con fenotipo de HF de nuestra población y obtener un valor de corte preliminar para el GRS-E en nuestra población. Se calculó el GRS-E en 66 pacientes con clasificación clínica de HF probable o definitiva, estudiados previamente con NGS y con el GRS-C. No hubo diferencia entre el valor de colesterol LDL en individuos con GRS positivo y con GRS negativo (p=0,29). 22/66 fueron portadores de mutaciones en genes asociados a HF. El valor de corte preliminar para el GRS-E en nuestro ambiente fue de 0.785 y no se observaron diferencias en la aplicación de este valor y el planteado para la población caucásica en esta muestra. El GRS-C resultó positivo (valor de corte ≥1,96) en n=14/66, y GRS-E (>0,76) en 23/66. Hubo coincidencia de resultados en 68% de los casos (chi2 p=0,003). La sensibilidad y especificidad del GRS-C fue de 20% y 94% y del GRS-E de 33% y 76%. La curva ROC mostró un área de 0,72 en GRS-C (IC 0,58-0,86) y en GRS-E de 0,54 (IC 0,38-0,69), con diferencia significativa entre ambas (p=0,01). Los dos GRS presentaron gran coincidencia en esta muestra, el GRS-C fue superior y tuvo mayor especificidad, pero ambos mostraron buen rendimiento y podrían contribuir en la detección de hipercolesterolemias de origen poligénico en nuestra población.

BIBLIOGRAFÍA

- DeLong, ER et al. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: A nonparametric approach. Biometrics. 1998 44: 837–845.
- Futema et al. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. Clin Chem. 2015 Jan; 61:231-8.
- Wang et al. Polygenic Versus Monogenic Causes of Hypercholesterolemia Ascertained Clinically. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016 Dec;36(12):2439-2445.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA *STEM CELL* LEUCÉMICA ($CD26^{+}$) EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA. DETERMINAR SU IMPACTO PRONÓSTICO EN LA REMISIÓN MOLECULAR PROFUNDA Y LA DISCONTINUACIÓN DEL TRATAMIENTO

Raquel M. Bengió, Margot Peña,
María Fernanda Palacios, Irene B. Larripa

Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex"
IIHEMA - Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa clonal caracterizada por la adquisición de una translocación cromosómica específica el denominado cromosoma Philadelphia (Ph') [t (9;22)(q34;q11)] (Rowley, 1973). Esta alteración citogenética produce el gen de fusión *BCR-ABL1*, que origina una proteína oncogénica, $p210^{BCR\text{-}ABL}$ con actividad constitutiva de tirosina kinasa (Melo, 2007). El estudio de la funcionalidad de esta proteína derivó en el desarrollo de un inhibidor de tirosina kinasa: el Imatinib y posteriormente otros inhibidores de segunda y tercera generación de ITKs, los cuales indujeron un cambio revolucionario en el tratamiento de la LMC (Druker, 2001) (Baccaran, 2013). Recientemente se ha demostrado que los pacientes con respuesta molecular profunda y sostenida podrían suspender dicho tratamiento bajo controles de *BCR-ABL1* cuantitativo. Sin embargo en aproximadamente la mitad de estos casos se ha verificado recurrencia molecular de la enfermedad, lo cual implica retratamiento. Las recaídas descriptas en ensayos clínicos, ocurrieron principalmente en los 6 primeros meses de suspensión del tratamiento y tardíamente, después de año, con menor frecuencia (Mahon, 2010) (Etienne, 2017). Es probable que la recaída después de la discontinuación del ITK sea debida a la persistencia de *Stem Cell* Leucémicas (SCL) quiescentes que son transcripcionalmente silentes y que sobreviven indefinidamente en nichos hipóxicos (Cheloni, 2017). Investigaciones recientes han identificado y caracterizado la SCL, las cuales expresan (CD45+/CD34+/CD38-/CD26+) por análisis de citometría de flujo. Este perfil fenotípico específico permite discriminar la SCL de la Stem Cell Hematopoyética normal (SCH) o las stem cells leucémicas pertenecientes a otras neoplasias mieloides. La expresión de CD26 (dipeptidilpeptidasa IV) junto al inmunofenotipo (CD45+/CD34+/CD38-) es clave para identificar la SCL de la LMC (Hermann, 2014). Estos datos serían de importancia para monitorear la dinámica de la SCL en pacientes en diferentes etapas de evolución de la enfermedad y para identificar posibles candidatos para discontinuar el tratamiento con ITK libres de recaídas.

Actualmente el seguimiento de la respuesta al tratamiento con ITK en LMC se realiza mediante el estudio de la cuantificación de los transcriptos *BCR-ABL1* por técnicas de RT-PCR en tiempo real. Esta metodología permite definir si el paciente se encuentra en respuesta molecular profunda (>de 4 log de reducción). Teniendo en cuenta los criterios

del European Leukemia Net (Baccarani, 2013) las definiciones de pacientes respondedores óptimos, *warning* o con fallo a los ITK se basa en la reducción logarítmica de los transcriptos *BCR-ABL1* alcanzada a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento. Si bien la cuantificación *BCR-ABL1* sigue siendo unos de los criterios fundamentales en el seguimiento de esta patología, trabajos recientes sugieren que la identificación de la SCL a lo largo de la evolución de la enfermedad sería sin duda un parámetro muy importante a tener en cuenta en la continuidad de la respuesta y en la recaída de la enfermedad.

El estudio de la SCL CD26+ refuerza el concepto que la medición exclusiva de *BCR-ABL1* no reflejaría exactamente la carga residual de la enfermedad. Teniendo en cuenta publicaciones recientes, la cuantificación de la SCL por citometría de Flujo representaría un aporte importante para el manejo terapéutico de la LMC. El estudio del porcentaje de las SCL circulantes CD26+ en etapas iniciales y su reducción en controles posteriores, representaría un factor pronóstico que podría aportar una información adicional para predecir una discontinuación exitosa del tratamiento.

OBJETIVOS

- Analizar en la LMC la stem cell leucémica (SCL) caracterizada por el inmunofenotipo: $CD45^{+}/CD34^{+}/CD38^{-}/CD26^{+}$ y en simultáneo la respuesta molecular en las diferentes etapas de evolución de la enfermedad.
- Evaluar si persiste la SCL en pacientes con respuesta molecular profunda y/o indetectable.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron muestras de sangre periférica (SP) extraídas con EDTA de 174 pacientes adultos, mayores a 18 años, 94 varones y 80 mujeres con diagnóstico de LMC en tratamiento con ITK de primera/segunda/tercera generación (imatinib, nilotinib, dasatinib,ponatinib). La edad media fue 48 años, rango 18-82. Las muestras de los pacientes se evaluaron en diferentes etapas de evolución de la enfermedad y provinieron del IIHEMA y de Instituciones derivantes. Se realizaron estudios moleculares de seguimiento con Real Time PCR (qRT-PCR) para cuantificar los transcriptos *BCR-ABL1*. En paralelo se efectuó el análisis por citometría de flujo para evaluar el compartimento **$CD45^{+}/CD34^{+}/CD38^{-}/CD26^{+}$** correspondiente a la SCL de la LMC. Los pacientes firmaron un consentimiento informado y se mantuvo la confidencialidad de toda la información según pautas éticas de la legislación nacional e internacional vigentes. La muestra de sangre periférica (10ml) fue tratada con buffer amonio, para lisar los glóbulos rojos y obtener un "pellet" de glóbulos blancos, a partir del cual se realiza la extracción del ARN con el método del Trizol (Life Technologies, GIBCO, BRL) y cloroformo. La respuesta molecular (RM) mediante la cuantificación en tiempo real de los transcriptos *BCR-ABL1* (p210) respecto del gen control *ABL1* se realiza utilizando el kit Molecular MD. Los valores obtenidos se expresan en escala internacional multiplicando por el factor de conversión de nuestro laboratorio (0,75). Este valor se obtuvo a partir del uso de los calibradores primarios de la WHO (Word Health Organization). Equipo utilizado: Rotor Gene (Qiagen).

La cuantificación de las células SCL por Citometría de Flujo se realizó en la misma muestra de sangre periférica utilizada en la cuantificación de los trancriptos *BCR-ABL1*. Se evaluó la expresión del antígeno CD26 (enzima dipeptidilpeptidasa IV, DPPIV) en células *stem* totales. La marcación de las muestras se realizó en 100 µl de sangre entera, con posterior hemólisis con FACS *Lysing solution* ™ (BD, dilución 1:10 en agua destilada) durante 10 min; centrifugación 5´a 1500rpm, lavado con *FACS flow* ™ (BD) y posterior centrifugación. Para la adquisición de las muestras marcadas se utilizó el citómetro de flujo FACS CANTO II (BD); FACS DIVA (versión 8, BD Biosciences) como software de adquisición y el Infinicyt™ (versión 1.8 Cytognos) como programa de análisis. Para el control diario de calibración del equipo se utilizan perlas de calibración (CS&T, BD). El panel de anticuerpos utilizado incluye los siguientes anticuerpos: CD45 (V450 clon 2D1), CD38 (FITC, clon HB7), CD26 (PE L272) y CD34 (PERCP Cyanina 5.5, clon 8G12).

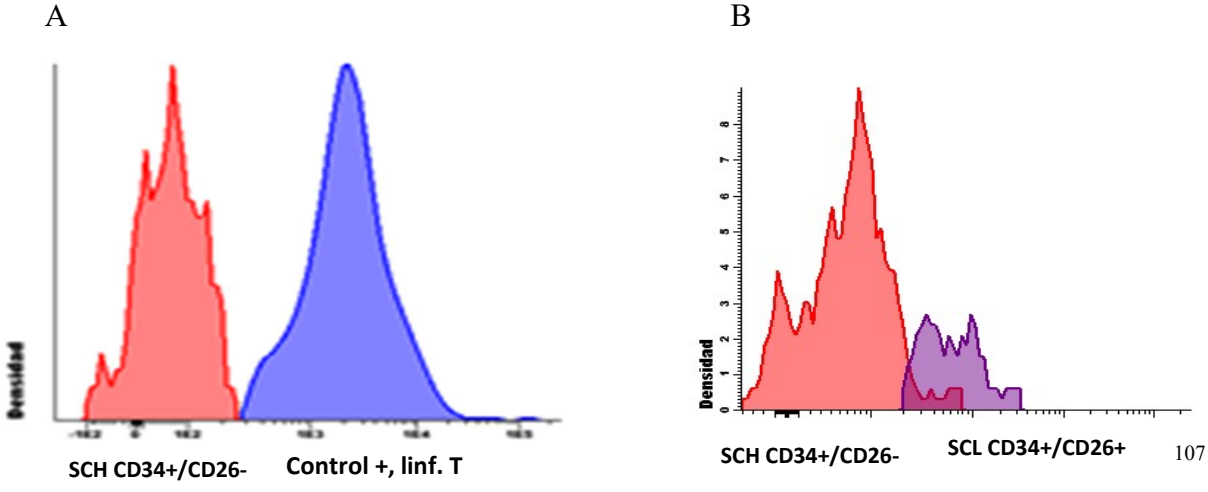
RESULTADOS

La respuesta molecular (RM) de los pacientes estudiados se clasificó en las siguientes categorías: 10/174 (**6%**) con RM Nula, 15/174 (**9%**) con RM Mínima, 28/174 (**16**%) con RM Menor, 47/174 (**27**%) con RM Mayor y 74/174(**42**%) con RM Profunda (incluye 29 $RM^{4.0}$, 41 $RM^{4.5}$, 4 $RM^{5.0}$) (Tabla 1). El inmuno-fenotipo CD26+ se observó en 42/174 (**24%**) de los casos analizados. La Fig 1A muestra el resultado del inmumo-fenotipo de un caso con ausencia de SCL mientras que en la Fig 1B se observa la presencia de la SCL.

Tabla 1. Respuesta Molecular.

RM	**Nº casos (%)**
RM Nula	**10 (6%)**
RM Minima	**15 (9%)**
RM Menor	**28 (16%)**
RM Mayor	**47 (27%)**
RM profunda	**74 (42%)**
Total	**174**

Figura 1: Inmunofenotipo Stem Cell Hematopoyetica normal (SCH) y Stem Cell Leucémica (SCL).



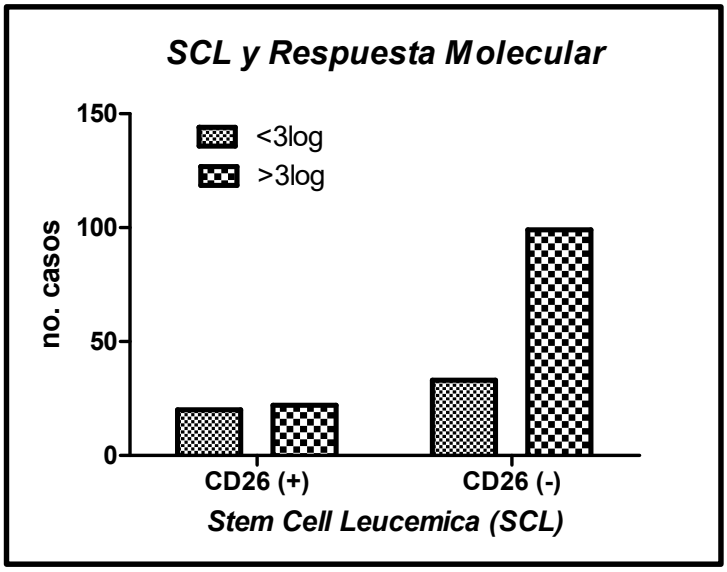
Cuando se tuvo en cuenta la presencia o ausencia de la SCL CD26+ respecto a la respuesta molecular alcanzada (≥3log o <3log) se observaron diferencias significativas [Fisher: **P<0.007**, OR: 2,73 (CI: 1,38-5,77)] (Tabla 2, Fig. 2).

Tabla 2: Distribución de la *stem cell* CD26+ y *stem cell* CD26- respecto a la RM.

LSC	< 3 log Reduction	≥ 3 log Reduction	Total
CD26 (+)	20	22	42
CD26 (-)	33	99	132
Total	53	121	174

P<0,007, OR: 2,73 (CI: 1,38 - 5,77)

Figura 2: Stem Cell CD26+ y CD26- y RM ≥3log o <3log.



p<0,007

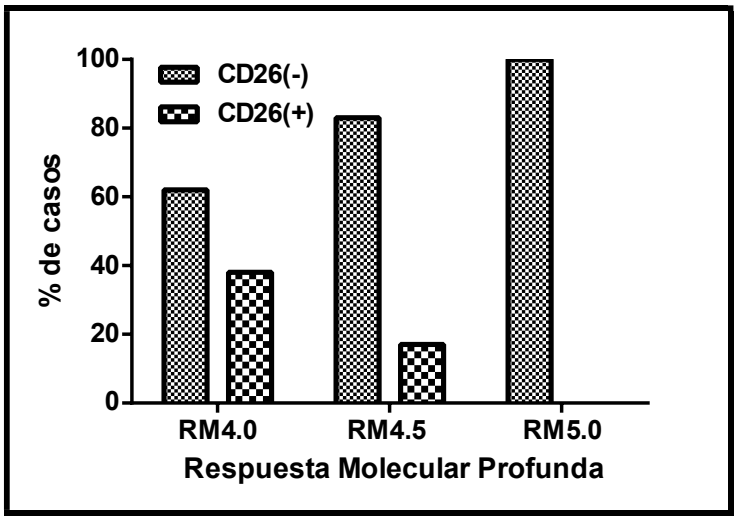
Se pudo constatar que a medida que incrementa la profundidad de la respuesta molecular, disminuye el porcentaje de casos con CD26+. Cuando se analizaron exclusivamente los 74 pacientes con RM Profunda se observó que el porcentaje de casos con persistencia de SCL CD26+ fue de 38%, 17% y 0% en $RM^{4.0,}$ $RM^{4.5}$ y $RM^{5.0}$ respectivamente.

Tabla 3: RM Profunda y Stem Cell CD 26(+) y CD26 (-).

	LSC CD26 (-)	LSC CD26 (+)	Total casos
RM4.0	21 (62%)	8 (38%)	29
RM4.5	35 (83%)	6 (17%)	41
RM5.0	4 (100%)	0 (0%)	4
Total casos	60	14	74

Si bien estos datos no muestran diferencias significativas, se observa un aumento de la Stem Cell Hematopoyética normal CD26 (-) a medida que aumenta la profundidad de la respuesta molecular (figura 3).

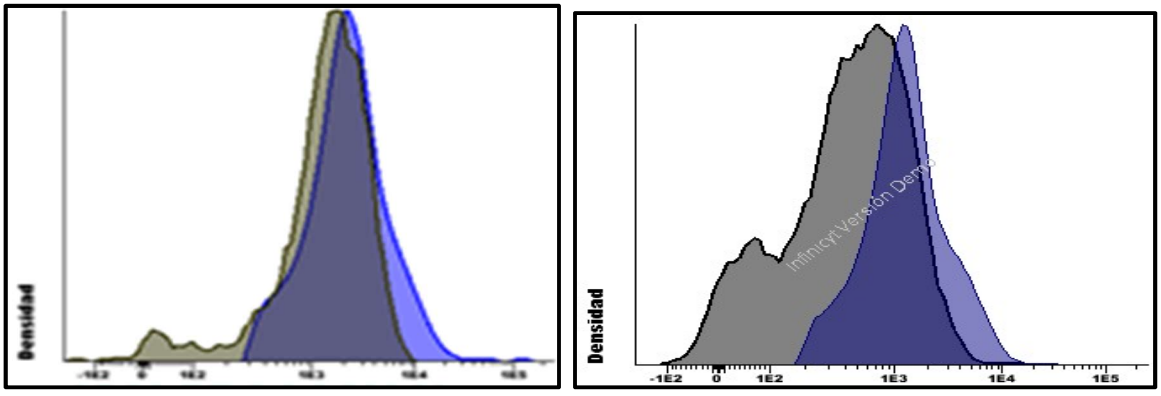
Figura 3: RM Profunda y % de Stem Cell CD 26 (+) y CD26 (-).



El análisis por citometría de flujo permitió constatar, un hallazgo ya descripto por Valent, (2018), donde se observa que la expresión de CD26 de los basófilos en los pacientes con LMC y SCL CD26+ presentan una intensidad de fluorescencia diferente a la observada en los basófilos de individuos normales. En la Figura 4 A: se observa la intensidad de fluorescencia de los basófilos (10^3) de pacientes sin SCL (CD26-) y RM profunda, mientras que en la figura 4B se observa una intensidad de fluorescencia menor (10^2) en casos con SCL CD26+.

Fig. 4.

A B



Curva azul: control + (linfocitoT), curva gris basófilos de pacientes CD26(-) y CD26(+)

DISCUSIÓN

La LMC es una neoplasia mieloproliferativa caracterizada por el reordenamiento molecular *BCR-ABL1* (Deninger, 2000; Goldman, 2007), este marcador es el evento etiopatogénico que llevó al desarrollo de los ITK, los cuales cambiaron la historia natural de esta enfermedad (Druker 2008). La cuantificación de los transcriptos *BCR-ABL1* por

qRT-PCR (Hughes, 2006; Cross 2012, 2015) constituyen el *gold standar* para el monitoreo de la respuesta al tratamiento. Esta metodología permite evaluar la enfermedad mínima residual con alta sensibilidad, sin embargo es incapaz de detectar células neoplásicas que estén en un estado quiescente sin proliferación. Por lo tanto es muy importante poder incluir otros estudios que permitan caracterizar la SCL independientemente de su estado proliferativo, dado que la SCL puede presentar largos periodos de latencia (Chomel, 2011). La detección de la SCL permitiría investigar las recaídas en pacientes que han discontinuado el tratamiento (Mahon, 2010; Etienne, 2017), la cual podría relacionarse a la persistencia de la SCL a pesar de la ausencia de transcriptos *BCR-ABL1* (Hamilton 2012).

Nuevos enfoques investigando el inmunofenotipo han permitido discriminar la SCL de la LMC de la stem cell hematopoyética normal (Hermann, 2014; Culen 2016; Rapadori, 2019). El perfil CD45+/CD34+/CD38-/CD26+ por citometria de flujo caracteriza la SCL, la cual está ausente en medula ósea normal o leucemias mieloides agudas (Valent, 2014). Para confirmar que la SCL CD26+ esta específicamente expresada en los pacientes con LMC, Hermann y Col (2014) purificaron CD26 (+) y CD26 (-) de pacientes en fase crónica por cell sorting. Se pudo comprobar que solamente la SCL CD26+ mostraba el rearreglo genómico *BCR-ABL1* por FISH y qRT-PCR.

Teniendo en cuenta toda esta información en este estudio se evaluó en la misma muestra de sangre periférica la SCL por citometria de flujo y la cuantificación de los transcriptos *BCR-ABL1* por qRT-PCR en pacientes en diferentes estadios de la evolución de la enfermedad.

Nuestros datos mostraron que dentro del grupo de pacientes con buenas respuestas moleculares (≥3log de reducción de los transcriptos *BCR-ABL1*) el 18% presentaban persistencia de la SCL CD26+. Mientras que en el grupo con RM <3log el porcentaje de casos CD26+ se duplicó. El análisis de los 74 pacientes con RM Profunda mostró una disminución paulatina de la SCL CD26+ a medida que se optimiza la respuesta molecular. La SCL se comportaría como una célula quiescente y quizás persista aún en casos con RM indetectable. El análisis de ambos parámetros podría incorporarse en futuros ensayos clínicos durante el seguimiento de la LMC y más aún en los casos con perspectivas de ingresar en protocolos de discontinuación de tratamiento.

REFERENCES

- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. Blood 2013;122:872-84.
- Cross NC, White HE, Muller MC, et al. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. Leukemia 26: 2172–2175, 2012.
- Cross NC, White HE, Colomer D, *et al*. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. Leukemia 29: 999-1003, 2015.
- Culen M, Borsky M, Nemethova V*, et al*. Quantitative assessment of the CD26+ leukemic stem compartment in chronic myeloid leukemia: patient – subgroups, prognostic impact, and technical aspects. Oncotarget 7: 33016- 33024, 2016.

- Chomel JC, Turhan AG. Chonic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. Oncotarget 2: 713-727, 2011.
- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 96: 3343–3356, 2000.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ*, et al*. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 344:1031-1037, 2001.
- Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. Blood 112: 4808-17, 2008.
- Etienne G, Guilhot J, Rea D, *et al.* Long-Term floow up of the french stop imatinib (STIM1) study in patients with chronic myeloid leukemia. J Clinal Oncology 35: 298-305, 2017.
- Goldman J M. How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. Blood 110: 2828 – 2837, 2007.
- Hamilton A, Helgason GV, Schemionek M, *et al*. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. Blood 119:1501–1510, 2012.
- Herrmann H, Sadovnik I, Cerny-Reiterer S, *et al*. Depeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cell (LSC) in chronic myeloid leukemia. Blood 123:3951-3962, 2014.
- Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, *et al.* Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood 2006; 108:28-37.
- Mahon F, Rea D, Guihot J, *et al*. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 yeras. The prospective multicenter Stop Imatinib (STIM) trial. Lancet Oncol 11: 1029-1035, 2010.
- Melo J, Barnes D.Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. Nat Rev Cancer 7: 441-453, 2007.
- Raspadori D, Pacelli P, Sicuranza A, *et al*. Flow cytometry assesment of CD26+ leukemiuc stem cells in peripheral bloos: A single and rapid nea diagnostic tool for chronic myeloid leukemia. Cytometry Part B, 00B: 1-6, 2019.
- Rowley J. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 243: 290-293, 1973.
- Valent P, Sadovnik I, Racil A, *et al*. DPPIV (CD26) as a novel stem cell marker in Ph+ chronic myeloid leukemia. Europ J Clinical Investigations 44: 1239- 1245, 2014.
- Valent P, Horny H, Arock M. The underestimated role of basophils in Ph+ chronic myeloid leukrmia. Eur J Clin Invest 2018 Oct;48(10):e13000.

SUMMARY

Chronic Myeloid leukemia (CML) is characterized by the reciprocal translocation t(9;22)(q34;q21) resulting in the *BCR-ABL1* fusion gene and P210 oncoprotein with constitutive tyrosine kinase activity. It is known that patients with a deep and sustained molecular response could stop treatment with TKI after a period of complete molecular remission. But half of them on discontinuation may experience molecular recurrence, probably because of the persistence of Leukemic Stem Cell (LSC), which are transcriptionally quiescent during therapy. The expression of the enzyme dipeptidylpeptidase IV (CD26) is restricted to CD45+/CD34+/CD38- LSC in CML BCR/ABL1+, but is not found in other myeloid or lymphoid LSC. For this reason, it is considered a novel specific biomarker of neoplastic cell in CML.

The aim of this study was to detect the LSC (CD26+) in CML patients with different molecular responses (MR) and to assess if these cells persist even in deep molecular response (DMR).

Methods: 174 CML patients (94 males and 80 females) were evaluated for detection of LSC by flow cytometry and *BCR-ABL1* by qRT-PCR. The analysis of both studies was carried out simultaneously on the same sample, during the follow up at different time points after diagnosis and under TKI treatment (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib). Flow cytometry studies were performed with a panel of 4 antibodies: CD45/CD38/CD26/CD34 and qRT-PCR *BCR-ABL1* by Taqman method.

Results: It was observed that the group of patients with good MR (≥3log BCR-ABL1 reduction) had a significantly lower percentage of cases with LSC compared to those who had <3log reduction (P<0.0074, RO: 2.7). Although no significant differences were observed, the analysis of the 74 patients with RMP (29 in RM4.0/41 in RM4.5/4 in RM5.0) showed a decrease in the proportion of cases with persistence of LSC CD26 + being: 38%, 17% and 0% in $RM^{4.0}$, $RM^{4.5}$ and $RM^{5.0}$ respectively.

Conclusion: Our results showed that CML patients with MR ≥3log BCR-ABL1 reduction were significantly associated with lower proportion of cases with persistence of LSC. When the LSC analysis was performed exclusively in cases with DMR, we observed that the presence of LSC decreased as the depth of the molecular response increased.

Since the LSC is highly quiescent, it could be present even in cases with undetectable DMR. In our study LSC was not detected in **81%** (60/74) of cases **in DMR**, while in the remaining 19% (14/74), CD26+ cells remain despite of DMR. This new approach to the study of the LSC could be useful during the follow up of patients, especially if they would be included in clinical trials of treatment discontinuation.

COMUNICACIÓN ENTRE ÓRGANOS EN SITUACIONES DE INSULINO - RESISTENCIA Y SU SINERGISMO EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Gabriela Berg, Magalí Barchuk

Departamento de Bioquímica Clínica, Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica. INFIBIOC - CONICET - UBA

La enfermedad cardiovascular (ECV) es la principal causa de morbi- mortalidad tanto en países desarrollados como en desarrollo, aun luego del éxito de las terapias farmacológicas para disminuir los niveles de colesterol (c)-LDL. Parte del riesgo residual en los pacientes se debe al aumento en circulación de partículas remanentes ricas en triglicéridos (LRT) que resultan del catabolismo de VLDLs y quilomicrones[Varbo A,2017]. Las enzimas lipolíticas lipoproteína lipasa (LPL), lipasa hepática (LH) y lipasa endotelial (LE) son responsables parcialmente de los niveles de LRT circulantes. Durante décadas se identificó a la insulina como el principal regulador de la síntesis de LPL y LH[Deeb S, 2003;Kersten S, 2014], observándose en insulino-resistencia (IR) disminución de LPL[Miksztowicz V, 2014] y aumento de LH[Miksztowicz V, 2012 y 2014]. Por otra parte, la actividad de LPL se encuentra estimulada por cofactores como las apoproteínas (apo) CII y AV, e inhibida por apoCIII, siendo los estudios de regulación de LE más recientes y controversiales. En los últimos años, la identificación de nuevas proteínas reguladoras ha complejizado el estudio de las enzimas, así como la comprensión de su comportamiento en distintas situaciones metabólicas. Dentro de estos nuevos factores se proponen a las proteínas simil angiopoyetinas (ANGPTL) y al GPIHBP1 como reguladores de la actividad de LPL y LE[Zhang R, 2016; Young S,2011]. En situaciones de IR los niveles de los reguladores enzimáticos podrían alterarse, y esto condicionar la actividad de las enzimas diferencialmente, según el tejido de origen. En IR el tejido adiposo (TA) disfuncional, promueve un mayor flujo de ácidos grasos hacia el hígado, lo que favorece el depósito graso y como consecuencia un estado pro-inflamatorio, dando origen a la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA), actualmente considerada la enfermedad hepática crónica más frecuente en todo el mundo. En EHGNA, la alteración del tejido hepático podría condicionar la expresión y funcionalidad de distintos reguladores enzimáticos, entre ellos los niveles de ANGPTL-3 y -8 así como de apoCII y CIII, reguladores de LPL. En los últimos años ha surgido el concepto de "cross-talk" o diálogo entre distintos tejidos, siendo los mecanismos involucrados casi desconocidos. La identificación de vesículas extracelulares (VE) en circulación ha dado lugar a considerarlas como posibles intermediarias de la comunicación entre los distintos tejidos u órganos[Whitham M,2019].

Nuestro Objetivo General fue: en situaciones de IR, investigar el rol de reguladores de expresión y actividad de LPL y LH en distintos tejidos, e identificar si la acción local o distal de dichos reguladores se ejerce a través de la participación de posibles

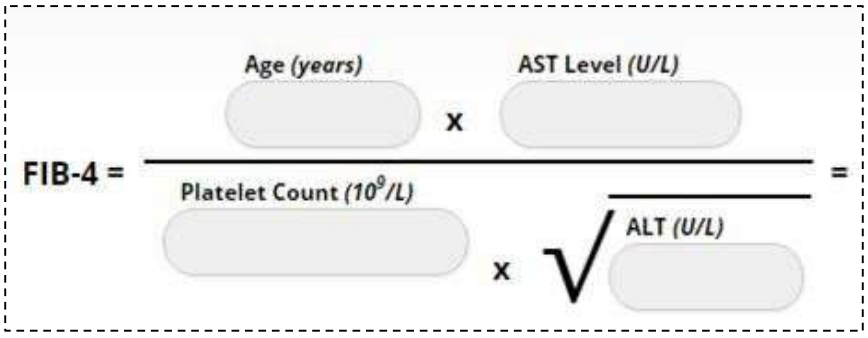
biomarcadores, en pos de mejorar el diagnóstico, pronóstico y/o la respuesta a posibles terapias.

Pacientes: se estudiaron adultos de ambos sexos, sometidos a colecistectomía laparoscópica electiva y biopsia hepática para el diagnóstico de EHGNA, provenientes del Servicio de Cirugía Gastroenterológica del Hospital de Clínicas.

Se recolectaron retrospectivamente datos demográficos de factores de riesgo cardiovascular, medicación previa, tabaquismo, tratamientos farmacológicos y otras patologías. Se excluyeron individuos que consumían más de 20 g/día de alcohol, con alteraciones tiroideas, renales, hepatopatías de origen viral o medicamentoso, infecciones concomitantes, pacientes tratados con glucocorticoides, amiodarona o cualquier droga que pudiera inducir hígado graso. Se diagnosticó síndrome metabólico según criterios del ATP III (ExpertPannel) y diabetes tipo 2 según criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA).

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas, "José de San Martín" de la Universidad de Buenos Aires. Los pacientes firmaron el consentimiento informado correspondiente y se respetó la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial en su última versión.

- Medidas antropométricas: A todos los pacientes se les midió peso, altura y se calculó el índice de masa corporal. Se midió tensión arterial y circunferencia de cintura.
- Muestras: Previo a la cirugía se obtuvo sangre entera, suero y plasma y una muestra histológica por biopsia laparoscópica de parénquima hepático y de tejido adiposo perihepático (TAP). A partir de las biopsias hepáticas se realizó el diagnóstico de EHGNA por estudio histopatológico, los pacientes con diagnóstico confirmado se incluyeron en el grupo de "casos" y los pacientes con biopsia negativa se consideraron "controles".
- En suero se determinaron niveles de glucemia, colesterol total, TG, c-HDL y c-LDL, y las enzimas hepáticas aspartato-aminotransferasa (AST), alanina- aminotransferasa (ALT) y gamma glutamil transpeptidasa (γGT) por métodos enzimático-colorimétricos, apoA-I y B por inmunoturbidimetría, niveles de PCR por método ultransensible (PCR-hs), en autoanalizador Cobas C-501 (Roche Diagnostics, Germany). Se calcularon los scores de fibrosis APRI, FIB-4 y NFS según:



VALOR ENCONTRADO DE FIB 4	INTERPRETACIÓN
Puntaje < 1.30	No hay fibrosis avanzada: F0-F1
FIB-4 > 1.30 a 2.67	Zona intermedia: requiere otra prueba diagnóstica
FIB-4 > 2.67	Con fibrosis significativa: F3-F4

NFS= -1.675 + 0.037 x age (years) + 0.094 x BMI (kg/m2) + 1.13 x IFG/diabetes (yes = 1, no = 0) + 0.99 x AST/ALT ratio – 0.013 x platelet (x109/l) – 0.66 x albumin (g/dl)

Explanation of Result :

NAFLD Score < -1.455 = F0-F2
NAFLD Score -1.455 – 0.675 = indeterminate score
NAFLD Score > 0.675 = F3-F4

- A partir de la extracción de las enzimas con buffer heparina a partir del endotelio vascular se midió la actividad de LH, en tejido adiposo perohepático se midió LPL. Se utilizó método radiométrico específico para cada una de ellas. Miksztowicz V, 2014.
- Se midió expresión de ANGPTL-3 y MTTP, mediante los niveles de mRNA en homogenato de TAP e hígado por RT-PCR y sus niveles proteicos por western blotting con anticuerpos específicos para cada proteína. La cuantificación se realizó respecto a β-actina utilizando el programa Fluorchem (Alpha Innotech Corp).
- Análisis Estadístico: Se utilizaron métodos paramétricos o no-paramétricos según la distribución de los datos para el análisis de diferencias entre grupos y correlaciones entre variables. Se realizó análisis de co-varianza (ANCOVA) utilizando distintas variables independientes. Se implementó regresión simple y múltiple para la asociación entre parámetros, y regresión logística, contemplando variables dicotómicas. Se utilizó el programa SPSS.19.

RESULTADOS

En el desarrollo del proyecto, se trabajó durante el año 2019-2023, (pandemia Covid-19 en el ínterin) en conjunto con el Servicio de Gastroenterología.

Se reclutaron 25 pacientes que fueron sometidos a colecistectomía y de los cuales se obtuvo también una muestra para biopsia hepática, para evaluación de EHGNA. Durante el respectivo procedimiento se obtuvieron muestras de hígado, Tejido Adiposo (TA) subcutáneo (TAS) y TA perihepático. Todas las muestras fueron derivadas a anatomía patológica para su análisis. Además, se obtuvieron muestras de suero, plasma y sangre entera.

Las características generales de los pacientes se muestran en la siguiente Tabla:

Características Generales			
Hombres/Mujeres (n)	7/17	DBT2 (n;%)	5(20)
Edad (años)	53±13	HTA c/tto (n;%)	9(64)
TAS (mm Hg)	120 (110-130)	DBT2 c/tto (n;%)	2(40)
TAD (mm Hg)	70 (60-90)	Estatinas (n;%)	3 (12)
IMC (kg/m^2)	29,1±5,0	Fibratos (n;%)	0(0)
IMC<24,9 (n;%)	6(25)	Riesgo bajo	7 (28)
IMC 25-29,9 (n;%)	6(25)	Riesgo moderado	11 (44)
IMC ≥30 (n;%)	12(50)	Riesgo alto	5 (20)
Hipertensos (n;%)	14(56)	Riesgo muy alto	2 (8)

Datos expresados como media ±DS o mediana (rango) según distribución de los datos. TAS tensión arterial sistólica, TAD tensión arterial diastólica, IMC índice de masa corporal, DBT2 diabetes mellitus tipo 2, HTA hipertensión arterial.

Las características bioquímicas de los pacientes se pueden observar en la Tabla siguiente:

Determinaciones Bioquímicas			
Glucemia (mg/dl)	96 (74-178)	TG* (mg/dl)	139±63
HbA1C* (%)	5,4 (5,0-6,8)	CT*(mg/dl)	174±54
Insulina* (µU/mL)	10,4±5,6	C-HDL* (mg/dl)	40±11
HOMA-IR*	2,53 (0,81-6,19)	C-LDL* (mg/dl)	135±41
Ácido úrico (mg/dl)	18,9±17,4	APO AI* (mg/dl)	131 (70-143)
Bilirrubina Total (mg/dl)	0,52±0,24	APO B* (mg/dl)	94±36
Bilirrubina Directa (mg/dl)	0,2 (0,1-0,7)	C-no HDL* (mg/dl)	134±50
ALT (U/L)	26 (10-97)	TG/C-HDL*	3,47 (1,30-8,92)
AST (U/L)	20 (11-114)	CT/C-HDL*	4,45±1,40
AST/ALT	0,99±0,32	C-Rem* (mg/dl)	20 (6-183)
Plaquetas* (10^³/ul)	244±55		

Datos expresados como media ±DS o mediana (rango) según distribución. Determinaciones bioquímicas realizadas a 25 pacientes; las determinaciones indicadas (*) se aplicaron a un subgrupo de pacientes (n<25); HbA1C hemoglobina glicosilada A1C, HOMA-IR homeostatic model assessment – insulin resistance, ALT alanino-aminotransferasa, AST aspartato-aminotransferasa, TG triglicéridos, CT colesterol total, C-Rem colesterol de lipoproteínas remanentes.

Se determinó en las biopsias hepáticas la expresión del Receptor-VLDL por Western blot.

Se detectó expresión del receptor en los pacientes con EHGNA, sin correlación con los niveles de lipoproteínas remanentes (RLP). La expresión del R-VDLD mostró una tendencia a aumentar de acuerdo con el grado de esteatosis RU: 0,35 (0,21-0,68) en pacientes con <33% esteatosis, vs 0,64 (0,51-0,79) en pacientes con >33% (p=0.42) y también una tendencia a correlacionar con el score APRI (p=0.39).

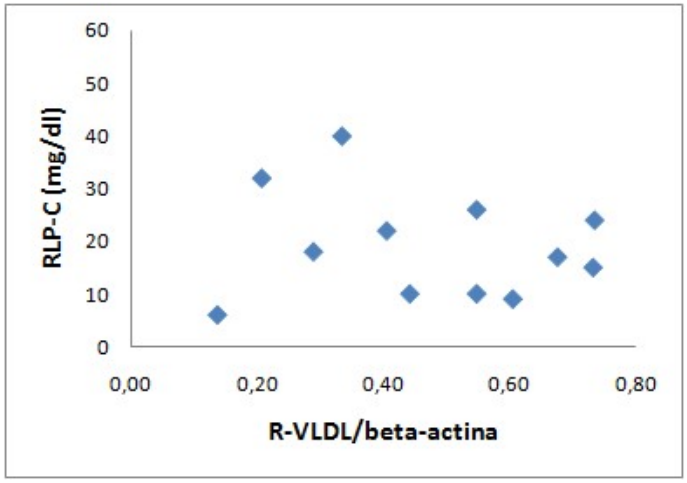


Figura 1: Distribución del R-VLDL según los Remanentes lipoproteicos.

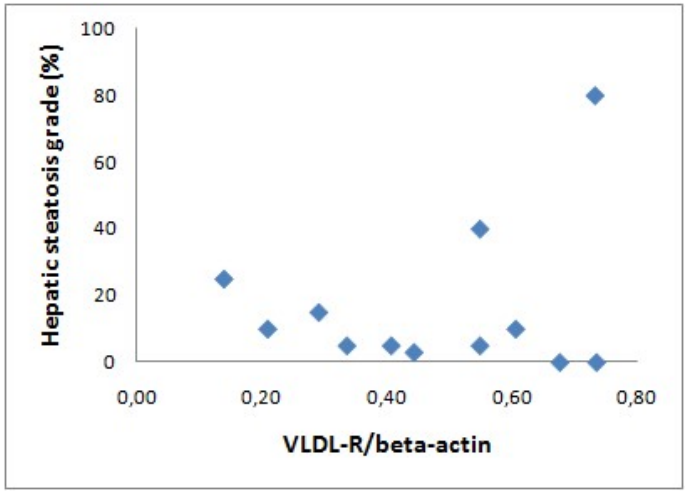


Figura 2: Correlación R-VLDL-% Esteatosis.

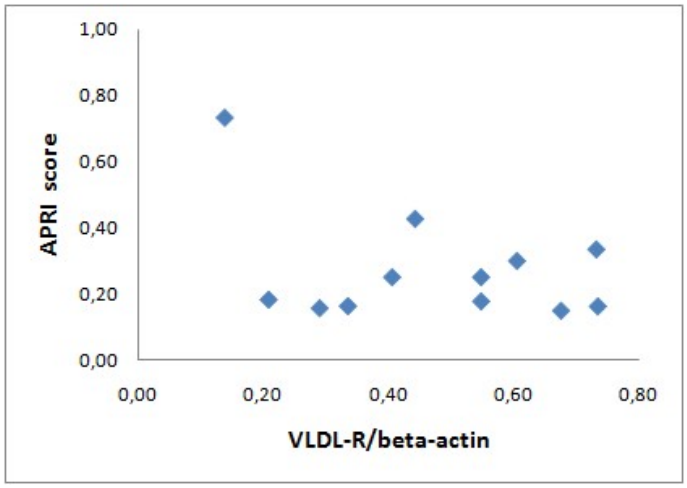


Figura 3: asociación entre R-VLDL y APRI Score

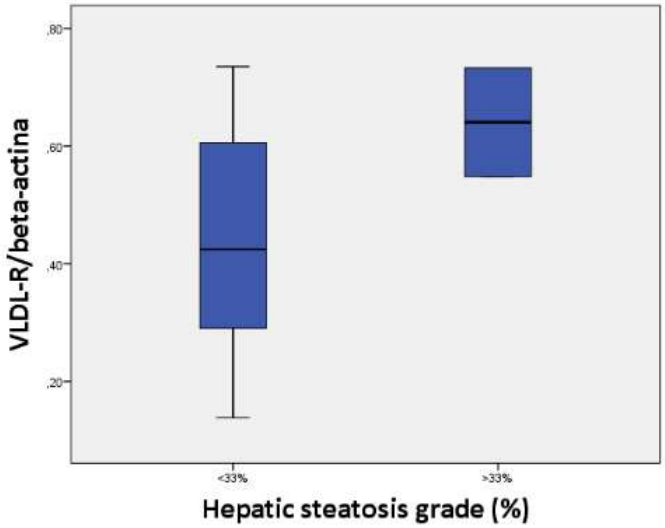
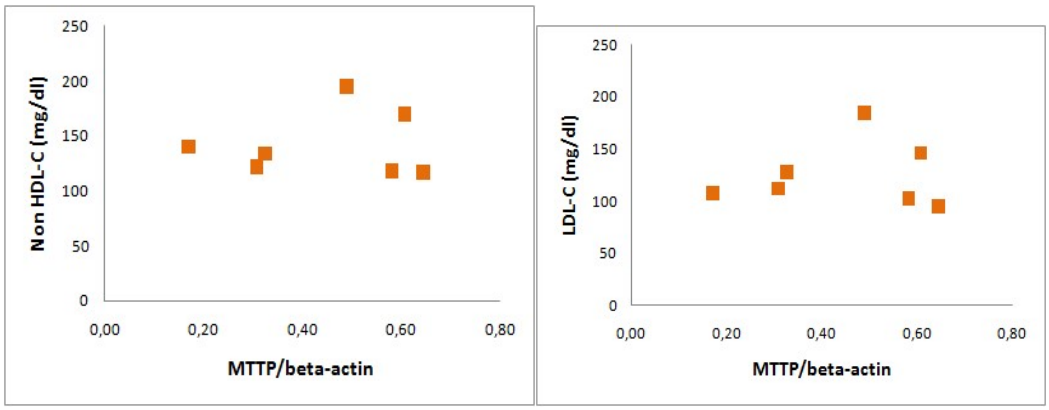


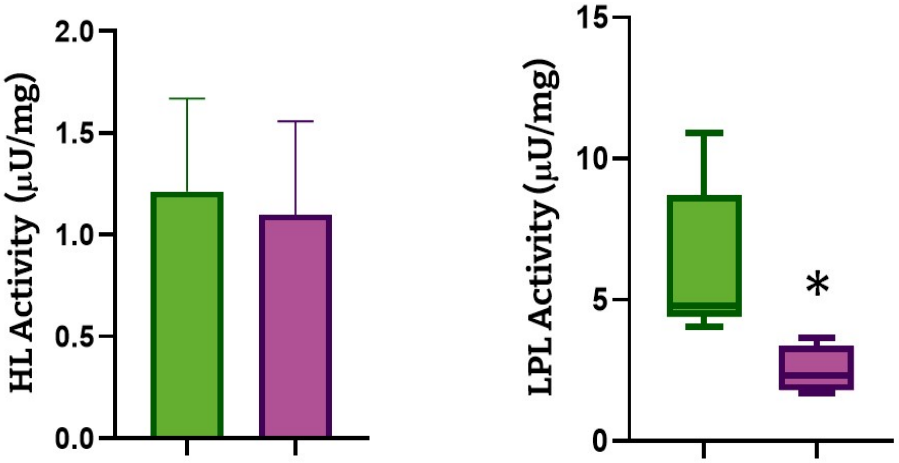
Figura 4: RU 0.40±0.20 vs 0.64±0.20.

A su vez, se evaluó la expresión de la proteína MTTP en tejido hepático, la cual mostró una tendencia a asociarse positivamente con el c-no-HDL (p=0.06) y con el c-LDL (p=0.07).



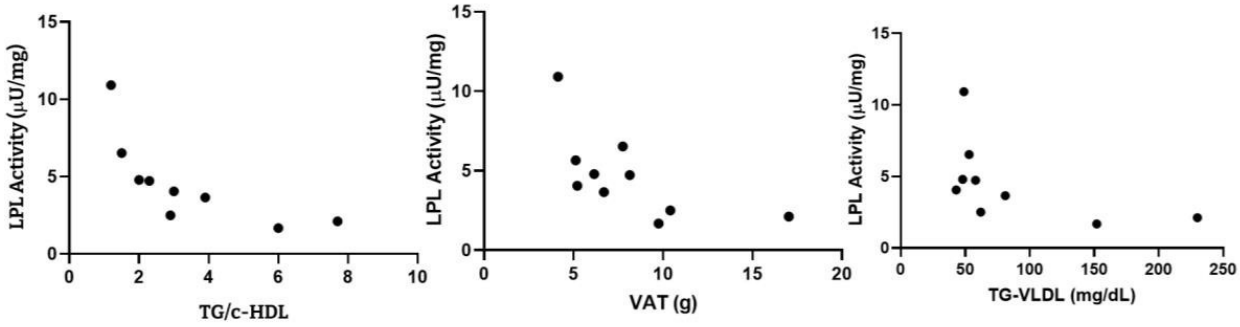
Figuras 5 y 6: Distribución de la expresión de MTTP según los niveles de Col No-HDL y Col-LDL.

Se procedió a la medición de la actividad de la enzima Lipasa Hepática en las biopsias de hígado de pacientes y controles, y actividad de Lipoproteína Lipasa en tejido adiposo perihepático. No se detectaron diferencias en la actividad de Lipasa hepática entre grupos, en tanto se observó una tendencia a menor actividad de Lipoproteina lipasa en el grupo de pacientes con mayor grado de esteatosis.



Figuras 7 y 8: Actividad de LH y LPL en controles (barra verde) y pacientes (barra rosa).

r= -0,9333; p<0,05. Spearman *r= -0,7333; p<0,05. Spearman* *r= -0,7091; p<0,05. Spearman*



Figuras 9 a 11: correlaciones entre la actividad de LPL y distintos marcadores de insulino resistencia y obesidad abdominal (VAT).

La menor actividad de Lipoproteína Lipasa correlacionó inversamente con los marcadores de insulino-resistencia y con la obesidad abdominal.

Paralelamente, no se encontró diferencias en la expresión proteica de ANGPTL3 entre grupos, si bien se observó una tendencia a mayor concentración en los pacientes.

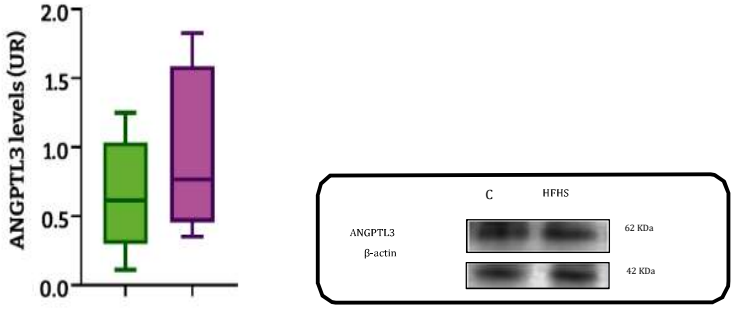


Figura 12: expresión proteica de ANGPTL3 medida por western-blot (barra verde: controles, barra rosa: pacientes).

CONCLUSIONES

La expresión del R-VLDL mostró una tendencia a estar aumentado en los pacientes con mayor grado de esteatosis, esto participaría en el flujo de remanentes hacia el hígado y el mayor depósito graso. La disminución en la actividad de LPL en el tejido adiposo perihepático de los pacientes se asoció al mayor grado de insulino-resistencia. La actividad de LH no llegó a mostrar una disminución notable en función del grado de esteatosis. La expresión de los reguladores no mostró diferencias entre grupos, si bien se observó una tendencia a mayor concentración de ANGPTL3 en pacientes. Dado el rol de esta proteína como inhibidor negativo de LPL, los resultados serían coincidentes y un mayor número de pacientes probablemente permitirá obtener resultados concluyentes.

La alta prevalencia de la EHGNA y su indiscutible asociación con la ECV hacen imperativo conocer los mecanismos subyacentes y los actores involucrados, tanto en esta asociación como en la progresión de la enfermedad. En el contexto de la visión actual de la fisiopatología de la EHGNA, el protagonismo de otros factores como vesículas extracelulares y miARN debe ser contemplado con el fin de clarificar puntos clave en la evolución de la enfermedad. Sumada a estos últimos, la comunicación entre el hígado y el TA es fundamental en los fenómenos mencionados, y los mediadores de este diálogo, implicados en la aparición de la hipertrigliceridemia característica, deben ser motivo de estudio de trabajos futuros, con el objetivo de esclarecer la complejidad de la EHGNA.

BIBLIOGRAFÍA

- Varbo A, Nordestgaard BG. Remnant lipoproteins. Curr Opin Lipidol 28(4):300-307, 2017.
- Deeb SS, Zambon A, Carr MC, Ayyobi AF, Brunzell JD. Hepatic lipase and dyslipidemia: interactions among genetic variants, obesity, gender, and diet. J Lipid Res. 2003 Jul;44(7):1279-86. doi: 10.1194/jlr.R200017-JLR200. Epub 2003 Mar 16. PMID: 12639974.

- Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. Biochim Biophys Acta. 2014 Jul;1841(7):919-33. doi: 10.1016/j.bbalip.2014.03.013. Epub 2014 Apr 8. PMID: 24721265.
- Miksztowicz V, Schreier L, McCoy M, Lucero D, Fassio E, Billheimer J, et al. Role of SN1 lipases on plasma lipids in metabolic syndrome and obesity. Arterioscler Thromb Vasc Biol 34(3):669-675, 2014.
- Miksztowicz V, McCoy MG, Schreier L, Cacciagiú L, Elbert A, Gonzalez AI, Billheimer J, Eacho P, Rader DJ, Berg G. Endothelial lipase activity predicts high-density lipoprotein catabolism in hemodialysis: novel phospholipase assay in postheparin human plasma. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 Dec;32(12):3033-40. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300110. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23104846.
- Zhang R. The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking. Open Biol. 2016 Apr;6(4):150272. doi: 10.1098/rsob.150272. PMID: 27053679; PMCID: PMC4852456.
- Young SG, Davies BS, Voss CV, Gin P, Weinstein MM, Tontonoz P, Reue K, Bensadoun A, Fong LG, Beigneux AP. GPIHBP1, an endothelial cell transporter for lipoprotein lipase. J Lipid Res. 2011 Nov;52(11):1869-84. doi: 10.1194/jlr.R018689. Epub 2011 Aug 15. PMID: 21844202; PMCID: PMC3196223.
- Whitham M, Febbraio MA. Redefining Tissue Crosstalk via Shotgun Proteomic Analyses of Plasma Extracellular Vesicles. Proteomics. 2019 Jan;19(1-2):e1800154. doi: 10.1002/pmic.201800154. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30350444.

ABSTRACT

Defined by the presence of steatosis in hepatocytes, in the absence of other causes of chronic hepatic diseases, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most frequent hepatic pathology in the adult population worldwide. It is associated with obesity, and identified as a risk factor for different pathologies, such as type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease as well. Hypertriglyceridemia and remnant lipoproteins accumulation are the main features of this pathology, yet the underlying mechanisms are not completely identified.

Given the importance of NAFLD, its association with cardiovascular diseases and the emerging research about new actors involved in the development of hypertriglyceridemia, it is necessary to study the underlying mechanisms of dyslipidemia, focusing on the cross-talk between two protagonic tissues: liver and adipose tissue.

The role of different mediators of this cross-talk, such as lipolytic enzymes regulators like ANGPTL3, Triglycerides protein transfers (MTTP) and lipoproteins receptors (R-VLDL) is emerging, and deserve to be studied. The crucial contribution of these new mediators sheds light to the development of new therapeutic alternatives or their use as biomarkers in the pathology.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y FACTORES DE RIESGOS ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR TOXOCARA EN UNA POBLACIÓN DE NIÑOS DEL NORDESTE ARGENTINO

María Viviana Bojanich [2, 1], Aldana Sosa [1], Saskia Meyer [1],
María de los Ángeles López [1, 2], Marcelo Medina [1]

[1] Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste.
[2] Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura,
Universidad Nacional del Nordeste

INTRODUCCIÓN

La Toxocariosis humana es una de las helmintiasis zoonóticas más comunes, causadas por larvas de nematodos del género *Toxocara*; siendo *Toxocara canis (T. canis)*, parásito del perro, el más comúnmente encontrado. Sus huevos pueden sobrevivir aproximadamente 3 años en condiciones ambientales favorables para ellos, por lo cual se pueden encontrar en el suelo de diferentes zonas habitadas por el hombre; es por esto, que el suelo es considerado la principal fuente de infección para los humanos, sobre todo en niños que tienen hábitos de geofagia, que juegan en los parques y que conviven con perros que están parasitados, constituyendo el grupo más expuesto y estos últimos constituyen algunos de los factores de riesgo más importantes para la infección[1]. La infección humana por *T. canis,* generalmente es causada por ingestión de huevos del medio ambiente. Luego emergen las larvas de la segunda etapa (L2) que migran a tejidos y órganos como hígado y los pulmones; permanecen allí por un largo período, sin crecer ni diferenciarse. La migración de las larvas hacia la sangre periférica se asocia generalmente a hipereosinofilia e induce infiltración eosinofilica en órganos profundos como el hígado, pulmones, cerebro y músculos. *Toxocara* típicamente causa dos síndromes severos llamados larva migrans visceral (VLM) y larva migrans ocular (OLM). Durante las últimas dos décadas, otros dos síndromes se han descripto: toxocariosis común y toxocariosis encubierta. Estos síndromes no son tan severos y se curan espontáneamente en la mayoría de los casos. Desde la primera descripción clínica de toxocariosis con la ayuda de técnicas de diagnóstico más sensibles y específicas que detectan anticuerpos dirigidos contra los antígenos de excreción-secreción de *T. canis* (TES), el espectro clínico de toxocariosis se ha ampliado[2]. Hoy en día, existen numerosos casos asociados con manifestaciones en la piel, entre las más frecuentes, está la urticaria crónica[3], prurito crónico, prurigo crónico y dermatitis misceláneas. Nuestro objetivo, fue determinar la asociación de manifestaciones clínicas y factores de riesgo en la infección por *Toxocara canis* en una población infantil del nordeste argentino.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio incluyó niños de ambos sexos, edades 1-16 años, entre los años 2019-2020, de zonas urbanas, periurbanas y rurales de la provincia del Chaco y Corrientes, con similares carencias socioeconómicas, pero con diferentes condiciones sanitarias en sus lugares de vivienda y que fueron atendidos por diferentes afecciones en Consultorios Médicos de la Obra Social de Camioneros y del Instituto de Medicina Regional de la UNNE.

Los pacientes incluidos en el trabajo de investigación, debieron completar una ficha clínico-epidemiológica y firmar un consentimiento informado. Se les tomó una muestra de sangre para el estudio serológico y se les realizó una anamnesis, donde se consignaron datos epidemiológicos, socio-sanitarios, ambientales (edad, sexo, características de la vivienda, disponibilidad de agua potable y contacto con animales en el hogar)

RESULTADOS

Se estudiaron en total, 75 pacientes, edades comprendidas entre 1 y 16 años, edad promedio de 6 años y predominio de sexo femenino (53,9%). Del total de pacientes estudiados, 20 (26,3%) tuvieron serología positiva para *Toxocara*.

Las manifestaciones clínicas que presentaron los pacientes seropositivos fueron: eosinofilia 30%, uveítis 15%, atopia 10%, dermatitis 5%, urticaria 5%, prurigo 5%, mientras el 30% restante presentó otras manifestaciones (ceguera, alopecia, hiper IgE).

En los pacientes seropositivos, los factores de riesgos asociados fueron: vivienda rural 10%, contacto con perros 80%, contacto con gatos 5% y contacto con perros y gatos 5%.

El 75% de las viviendas estaban sobre calles de tierra, teniendo agua potable el 90% de las mismas.

DISCUSIÓN

La toxocariosis, es una zoonosis de distribución universal, y es una de las infecciones helmintozoonóticas más comunes en el mundo y detectada con mayor frecuencia en niños, ya que, por sus hábitos higiénicos y su contacto con animales constituyen el grupo más expuesto. Estos datos coinciden con nuestros hallazgos. Por su alcance y extensión, puede considerarse como un problema de salud pública y enmarcarse en la lista de enfermedades desatendidas[4].

La tasa de infección por *T. canis* en nuestra población fue del 26,31%, esto se correlaciona con estudios de otros autores que refieren una tasa de infección similar a la hallada por nosotros[5]. Cualesquiera de estas cifras resultan llamativas, ya que, lo deseado, sería que ningún niño estuviese afectado por este tipo de parasitosis; sin embargo, estas situaciones se deben a la estrecha convivencia que mantienen los seres humanos, especialmente los niños, con sus mascotas, y a la ausencia de normas higiénicas adecuadas en las familias y a la falta de conocimientos sobre dichas enfermedades, así como los factores de riesgo que predisponen a la presencia de las mismas. Respecto a lo último, el 10 % de las viviendas eran de área rurales, las restantes correspondían a áreas urbanas (90%). Esto correlaciona con datos hallados por otros autores, los cuales afirman que esto se debe a que los suelos de zonas urbanas[6] (jardines, parques públicos y terrenos de juegos), se encuentran más contaminados con huevos de *Toxocara* en comparación con suelos de

zonas periurbanas y rurales. También, hemos hallado que el 75% de las viviendas se encuentran en calles de tierra, y un 90% poseían agua potable.

El espectro de manifestaciones clínicas de la toxocariosis varia ampliamente desde casos asintomáticos hasta infecciones generalizadas[11]. Por lo expuesto es aconsejable que, ante manifestaciones clínicas recurrentes, en presencia de una hipereosinofilia, sin hallar una causa a pesar de la repetición de exámenes clínicos, se debería pensar de toxocariasis, dada su alta prevalencia en esta región.

CONCLUSIÓN

El contacto con perros y gatos es un factor omnipresente en los hogares y constituye el factor de riesgo de mayor significación, así como la vivienda sobre calle de tierra. Esto sugiere que el peridomicilio es la principal fuente de contaminación para habitantes de zonas urbanas. Respecto a las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son muy inespecíficas, por lo cual es necesario una anamnesis detallada y evaluación física acompañada de pruebas de laboratorio generales y específicas para lograr un diagnóstico apropiado; sobre todo en zonas con alta endemicidad de esta patología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reyna J., Limón A., Nova R. Invasión intestinal por *Toxocara canis* como diagnóstico diferencial de linfoma: informe de un caso. Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, 2007; 27(3): 100-102.
2. Gavignet, B., Piarroux, R., Aubin, F., et. al. Cutaneous manifestations of human Toxocariasis. Journal of the American Academy of Dermatology. 2008; 59, 1031–1042.
3. Cribier B, Noacco G. Chronic urticaria and infectious diseases. Ann Dermatol Venerseol 2003;130(Suppl):S43-52.
4. Rojas-Salamanca AC, León-Bustamante MC, Bustamante-Saavedra OR. *Toxocara canis*: A worldwide frequent zoonosis. Rev Cien Agri 2016;13(1): 19-27.
5. Bojanich, M: López, M: Fernández, G: Azula, L: Alonso, J: Infección por toxocara canis en población infantil vulnerable de Noreste de Argentina. Universidad Nacional del Nordeste (argentina 2006). Disponible en: http/www.unne.edu.ar/med_regional/boletín/2007/inmunología_Txcenninios.pdf[Consultado el 31.12.2008].
6. Mizgajska H. Eggs of Toxocara spp. In the environment and their public health implications. J Helminthol 2001: 75: 147-151.
7. Flores A. Toxocariosis: zoonosis por nematodos. Rev Nuestros Perros, Madrid, España. 1992;5:6.
8. Schenone H. Parasitosis humana que pueden ser causadas o transmitidas por mascotas domésticas en Chile. Bol Chil Parasitol. 1987;42:16-23.
9. Taranto N, Passamonte L, Marinconz R, Marzi M, Cajal S, Malchiodi E. Parasitosis zoonóticas transmitidas por perros en el Chalco Salteño. Medicina. 2000;60(2):217-20.

10. Vásquez O, Martinez I, Tay J, Ruiz A, Pérez A. Verduras de consumo humano como probable fuente de infección por Toxocara sp. para el hombre. Bol Chil Parasitol. 1996;51:47-9.
11. Pawlowski Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatmentdilemma. J Helminthol. 2001;75 (4):299-305.

SUMMERY

Human toxocariasis is one of the most common zoonotic helminthiasis, caused by larvae of nematodes of the genus *Toxocara*. Soil is considered the main source of infection, especially in children whose play habits include yards and parks. *Toxocara* typically causes two syndromes called visceral larva migrans (VLM) and ocular larva migrans (OLM). Two other syndromes have been identified: common toxocariasis and covert toxocariasis. There are numerous cases associated with skin manifestations, with the most frequent being chronic urticaria, chronic pruritus, and dermatitis. The objective was to determine the association of clinical manifestations and risk factors in *Toxocara canis* infection in a pediatric population from northeastern Argentina. A retrospective study was conducted, reviewing clinical-epidemiological records of children of both sexes, ages 1-16 years, between the years 2019-2020. The study included urban, peri-urban, and rural areas of the provinces of Chaco and Corrientes. Out of a total of 75 patients studied, a predominance of females (41), accounting for 53.94%, and an average age of 6 years were found. Of the total number of patients studied, 20 tested positive for *Toxocara* serology, equivalent to 26.31% of the total. Among these patients, the clinical manifestations presented, in order of frequency, were: eosinophilia 30%, other manifestations 30% (blindness, alopecia, hyper IgE), uveitis 15%, atopy 10%, and lastly, corresponding to 5% each, dermatitis, urticaria, and pruritus. The associated risk factors were as follows: rural housing 10%, presence of dogs as pets 80%, cats 5%, and contact with both 5%. 75% of the households were located on dirt roads, with 90% of them having access to drinking water. Contact with dogs and cats is an omnipresent factor in homes and constitutes the most significant risk factor, as well as living on dirt roads. This suggests that the peridomiciliary environment is the main source of contamination for residents in urban areas. Regarding the clinical manifestations of this disease, they are highly nonspecific, thus requiring a detailed medical history, physical evaluation, and accompanied by general and specific laboratory tests to achieve an appropriate diagnosis, especially in areas with high endemicity of this pathology.

Key words: *Toxocara*, Clinical Manifestations, Risk Factors.

BÚSQUEDA DE UN BIOMARCADOR MOLECULAR TEMPRANO, PREDICTOR DE ESTADIO, DURANTE LA PROGRESIÓN DEL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Flavia Alejandra Bruna

Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer. IMBECU,
CCT - Mendoza - CONICET, Universidad Nacional de Cuyo

HIPÓTESIS

"ECRG2, es un buen biomarcador molecular temprano, que permite predecir el estadio molecular de lesiones orales durante la progresión natural del Cáncer de Células Escamosas de la Mucosa Oral (OSCC) permitiendo un diagnóstico más certero".

OBJETIVO GENERAL

Elucidar si los cambios en los niveles de expresión de ECGR2, se correlacionan a nivel molecular e histológico con la progresión natural del OSCC, en biopsias orales de pacientes con lesiones precancerosas (displasia) o cancerosas (OSCC).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OE1 Evaluar los niveles de expresión génica de ECRG2 de biopsias de pacientes con displasia y OSCC.

OE2 Correlacionar los resultados del OE1 con cambios en la expresión de genes asociados a la progresión tumoral: EGF, EGFR, β-Catenina, Nf-KB, P53 y RB1.

OE3 Correlacionar los niveles de expresión génica y proteica de ECRG2 con el diagnóstico histológico de rutina.

OE4 Correlacionar los niveles de expresión génica y proteica de ECRG2 con la presencia/ausencia y/o abundancia de las proteínas EGFR, β-Catenina, P53 y RB1.

OE5 Evaluar mediante análisis *in silico* en el atlas de cáncer TCGA (canceratlas.cancer.org) los cambios reportados para ECRG2 y comparar con nuestra población de estudio.

OE6 Estudiar las vías de señalización del receptor ECRG2 y su vinculación con el factor de crecimiento epidérmico EGF en líneas celulares orales tumorales y no tumorales humanas.

MARCO TEÓRICO

El cáncer oral de células escamosas (OSCC) es detectado y diagnosticado en estadios avanzados en un 90 % de los casos debido a diversos factores tales como presencia de lesiones asintomáticas o diagnóstico y tratamiento erróneo de las lesiones potencialmente malignas (se confunden con llagas, ampollas y otro tipo de lesiones benignas). Esto disminuye la esperanza de vida del paciente y el éxito del tratamiento. Hasta la fecha, el procedimiento para diagnosticar y tratar el OSCC es altamente invasivo y ablativo dado que, es necesario remover quirúrgicamente la lesión en su totalidad, con un margen de seguridad, acompañado de un análisis posterior mediante biopsia y tratamiento por radio o quimioterapia (www.WHO.int.; 2020). Los biomarcadores moleculares pueden ayudar a predecir la probabilidad de progresión y estadificación de la enfermedad, así como la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares subyacentes, permitiendo el diseño de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas tempranas.

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS (OSCC)

El OSCC ocupa el sexto lugar en el ranking mundial de incidencia de cáncer con variaciones epidemiológicas entre las distintas regiones geográficas. Comprende alrededor del 90% de las lesiones orales cancerosas con una incidencia global de alrededor de 377.000 pacientes y una tasa de mortalidad de 177.000 [1-2]. En Argentina el número de casos se ha incrementado considerablemente en la última década, la Asociación Odontológica reportó más de 3 mil nuevos casos de OSCC en el 2011, cifra que aumentó significativamente en los últimos años. El 1.6% de los casos de cáncer es por OSCC, con una relación hombre:mujer de 2:1 en individuos de entre 50-60 años de edad [3]. Aunque la mayoría de los casos de OSCC están asociados con factores de riesgo como el consumo de tabaco y alcohol, se ha demostrado que una proporción significativa (20%) de cáncer oral se asocia a infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo (HPV) [4]. Sin embargo, los casos diagnosticados de OSCC asociado a HPV muestran un mejor pronóstico, con una mejor respuesta a la quimioterapia, la radiación y la cirugía [5]. Estos pacientes también muestran una respuesta inmune mejorada y una menor probabilidad de metástasis con tumores bien diferenciados, mientras que los pacientes con OSCC no asociado a HPV (80%), muestran tumores mal diferenciados y peor pronóstico [6]. **Por lo tanto, resulta de interés estudiar la biología de estos tumores cuya evolución es asintomática con un mayor grado de invasión a los ganglios vecinos** [7-8].

Los tratamientos utilizados a la fecha para el OSCC, son cirugía, quimio y radioterapia. Si bien son efectivos en un 50% de los casos, su tasa de éxito depende de que el tumor sea detectado y tratado en etapa temprana. A la fecha la tasa de mortalidad no ha cambiado y la de supervivencia es baja, con un 50% de recidivas [9]. Desafortunadamente, un 68% de los casos de OSCC se diagnostican en una etapa tardía de la enfermedad y por lo general mueren dentro de los primeros 30 meses [10]. La expectativa de vida es de 5 años (diagnóstico temprano); sin embargo, no supera el 12% si es detectado en etapas avanzadas. La OMS prevé un aumento mundial significativo de la incidencia de OSCC en las próximas décadas [10]. En Argentina el Programa Nacional de Cáncer Bucal (PRONACABU, MINSAL) recaba datos epidemiológicos desde 2017, a fines de actualizar el número de casos debido al incremento en los reportes de pacientes con OSCC en la última década (http://www.faosdir.org.ar/pdf/Resolucion754-E-2017). En 2018 se reportaron aproximadamente 18.1 millones de casos diagnosticados y 9.6 millones de

muertes por cáncer en todo el mundo, representando el cáncer oral el 2% respectivamente [1].

ETIOLOGÍA DEL OSCC

El OSCC incluye un grupo de neoplasias que afectan las partes blandas de la cavidad oral (cara interna de las mejillas, lengua, encías, paladar blando y paladar duro y glándulas salivales), representando la más frecuente de todas las neoplasias orales [8]. Los síntomas incluyen dolor, llagas ulceradas que no cicatrizan, abultamiento o piel engrosada, parches blancos o rojos, piezas dentales flojas, dificultad para masticar o tragar, hinchazón de la zona afectada y dolor de garganta [11]. El consumo excesivo de alcohol se considera uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo del OSCC, especialmente cuando se combina con los productos derivados del tabaco [12]. Otros factores de riesgo asociados son las infecciones virales por virus Epstein-Bar o HPV; reflujo gastroesofágico; exposición a gases derivados de la combustión, subproductos de plástico, polvo de madera, asbesto y vapores de gasolina; daño físico por rozamiento (prótesis viejas, dientes en mal estado), etc [13].

PATOGENIA MOLECULAR DEL OSCC

El OSCC surge como consecuencia de múltiples eventos moleculares combinados con la predisposición genética de un individuo y la exposición a carcinógenos ambientales [14, 15]. Dado que el epitelio oral se expone a diversos factores exógenos, está en mayor riesgo de desarrollar lesiones potencialmente malignas (LMPO), mediante la acumulación de alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores de tumores [8, 16]. El Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal tipo 1 (HER2/neu), Proteína 53 (P53), Retinoblastoma (RB1), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) en particular p50, y Citocromo P450 familia 4 subfamilia B miembro 1 (CYP4B1) son algunas de las moléculas “hallmarks” reportadas alteradas en la carcinogénesis [17, 18]. Los receptores HER (EGFR) son una familia de 4 proteínas transmembrana con actividad Tirosina quinasa (HER1-4) [19]. La sobreexpresión de HER se asocia a la oncogénesis mediante la activación de diversas vías de señalización intracelular [20, 21]. HER2 (C-erbB-2/ERBB2/ErbB2) juega un rol crítico en la proliferación, supervivencia, migración y angiogénesis, mediante la activación de las vías MAPK/ERK1/2 y Pi3K/Akt, alteradas en la carcinogénesis [22]. Varios estudios demostraron una marcada correlación entre la expresión de HER2 y un peor pronóstico en pacientes con cáncer de esófago [23]. La evolución del OSCC se compone de cuatro estadios histológicos: Lesiones Potencialmente Malignas Orales LPMO (hiperplasia → displasia), OSCC poco invasivo → OSCC invasivo [24]. Hiperplasia: Epitelio engrosado, leve inflamación, queratinización aumentada, sin atipias celulares. Displasia: pérdida de la polaridad de células basales, aumento de mitosis, hipercromatismo nuclear, queratinización y pleomorfismo celular. OSCC poco invasivo: Abundante pleomorfismo celular, hipercromatismo y figuras mitóticas anormales, inflamación y alteración de las citoqueratinas. OSCC invasivo: invasión de células escamosas tumorales en el estroma, marcada queratinización e inflamación crónica [12, 25]. Previamente en un modelo preclínico observamos que ECRG2, NF-κB(p50), TP53, CYP4B1 y RB1, disminuyen progresivamente en el OSCC, siendo SPINK7 el más evidente ($p<0.05$) [26, 27].

Sería deseable obtener biomarcadores moleculares que permitan predecir rápidamente los estadios de lesiones precancerosas en el OSCC, permitiendo identificar y clasificar las lesiones atípicas en la mucosa oral con respecto al estado de compromiso de los epitelios orales (hiperplasia, displasia, carcinoma precoz, carcinoma tardío, etc.) (www.science.gov, 2013). La biología molecular brinda nuevas herramientas pronósticas; lo que representa una enorme oportunidad para definir con más precisión el comportamiento biológico tumoral a nivel molecular, no detectado histológicamente. Estas técnicas permiten evaluar la expresión de ARN mensajero (ARNm) mediante RT-qPCR, lo que es extremadamente útil para localizar células tumorales que contienen expresión alterada de algunos oncogenes o genes supresores de tumores, con las ventajas de ser rápida, especifica y sensible (en comparación con técnicas de diagnóstico histológico). En base a estos antecedentes proponemos que los cambios en la expresión génica de ECRG2, P53, NF-κB, β-Catenina y RB1 podrían ser evaluados como una huella molecular o biomarcador temprano, predictor del OSCC.

Previamente en un modelo pre-clínico de OSCC, observamos que los niveles de ARNm de estos genes disminuyen progresivamente durante el avance de la patología. Estos cambios están relacionados con los cambios que se producen a nivel epitelial en la mucosa afectada durante el progreso del OSCC. Los resultados observados fueron validados con los análisis macroscópicos e histológicos en cada estadio del OSCC (hiperplasia, displasia y carcinoma). Por tanto, proponemos identificar un biomarcador de estado que permita el diagnóstico precoz de la OSCC utilizando RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) que complemente al actual diagnóstico histopatológico [25-27]. Esta técnica de detección es simple dado que la toma de muestra puede ser realizada por el odontólogo, estomatólogo o cirujano de cabeza y cuello, y el posterior análisis de laboratorio mediante la cuantificación de la expresión génica de ECRG2 acompañado de P53, NF-κB, β-Catenina y RB1 por qRT- PCR.

Por tanto, la disminución en la expresión del ARNm del gen ECRG2, acompañado de los cambios en algunos genes canónicos de la progresión tumoral del OSCC [P53, NF-κB, β-Catenina y RB1], sería un eficiente biomarcador molecular de estadio en lesiones orales, acompañando de forma más asertiva y eficiente el diagnóstico histológico en el OSCC, dado que su expresión durante la progresión del OSCC es inversamente proporcional al grado de avance de la lesión, permitiendo anticipar el diagnóstico mediante un abordaje no invasivo a través de un hisopado de células de la mucosa oral para el diagnóstico molecular.

RELEVANCIA DEL ESTUDIO

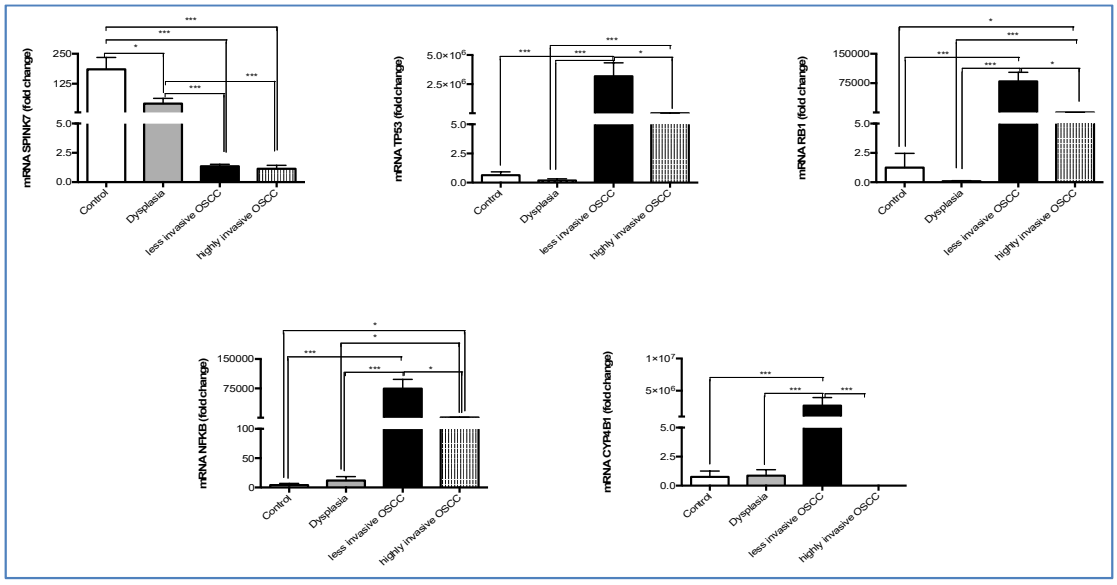
En nuestro grupo de trabajo previamente observamos en un modelo preclínico (animal) de OSCC, que los niveles de mRNA para NF-κB, TP53, ECRG2 y β-Catenina disminuyen progresivamente, y estos cambios se vieron co-relacionados con los cambios que se produjeron en el epitelio de la mucosa afectada durante el progreso del OSCC. Esta evidencia es consistente con reportes previos relacionados con la progresión de la lesión precancerosa a carcinoma [24-25], esto fue validado por análisis macroscópico e histológico durante cada estadio en la progresión natural del OSCC. En base a estos antecedentes, proponemos que: los cambios observados en la expresión conjunta de los genes NF-κB, P53, ECRG2 y Beta-Catenina (ARNm), son buenos biomarcadores predictivos del estadío de la lesión en el OSCC, dado que su regulación negativa en función del grado de avance en la lesión permitiría anticipar el diagnóstico temprano

mediante un abordaje no invasivo utilizando células de la mucosa oral humanas, mediante un método de bajo costo, rápido y altamente sensible.

RESULTADOS OBTENIDOS

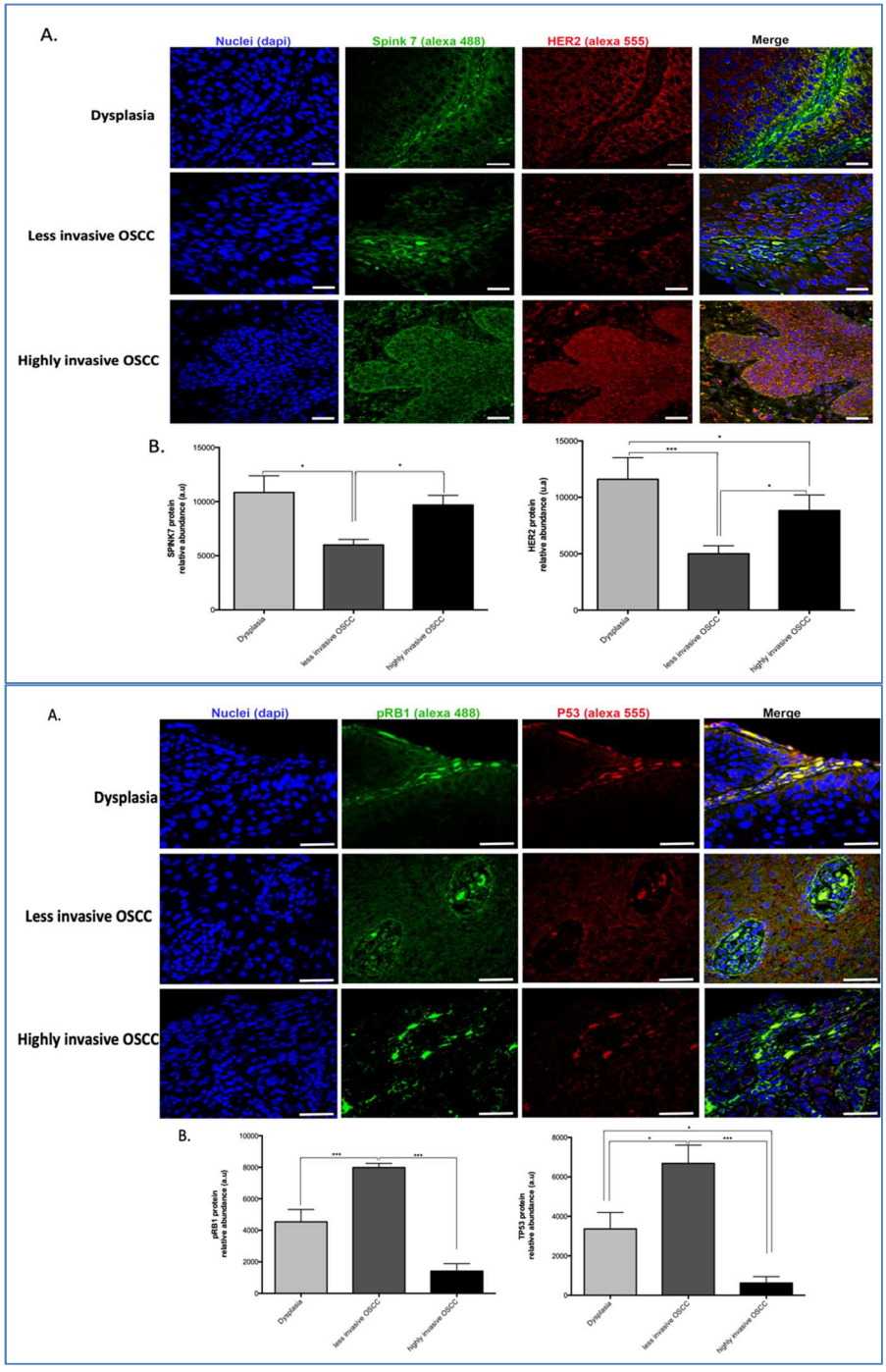
OE1. Evaluar los niveles de expresión génica de ECRG2. En el presente estudio se reclutaron y procesaron biopsias de pacientes con displasia (n=40) y con cáncer oral de células escamosas (OSCC) (n=40). Se pudo aislar material genético para evaluar la expresión génica de ECRG2 y observamos una menor expresión de este gen en el grupo OSCC respecto al grupo de displasia siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0.005$) (Fig 2 Pennacchiotti et al, DOI: 10.1038/s41598-021-86208-z).

OE2. Correlacionar los resultados del OE1 con cambios en la expresión de genes asociados a la progresión tumoral: ECRG2 (SPINK7), TP53, RB1, NF-κB y CYP4B1. Evaluamos la expresión génica en los pacientes de ambos grupos (displasia y OSCC; n=80) mediante análisis por PCR en tiempo real. Observamos cambios significativos en la expresión de estos genes entre los grupos ($p<0.005$). Los niveles de expresión de ECRG2 (SPINK7 novo gen supresor tumoral) se encontraron significativamente disminuidos en el grupo OSCC respecto del grupo displasia, mientras que los genes TP53, NF-κB, RB1 y CYP4B1 se encontraron significativamente ($p<0.005$) aumentados en el grupo OSCC, asociándose esto a un peor pronóstico (Fig 2, adaptado de Pennacchiotti et al, doi: 10.1038/s41598-021-86208-z).

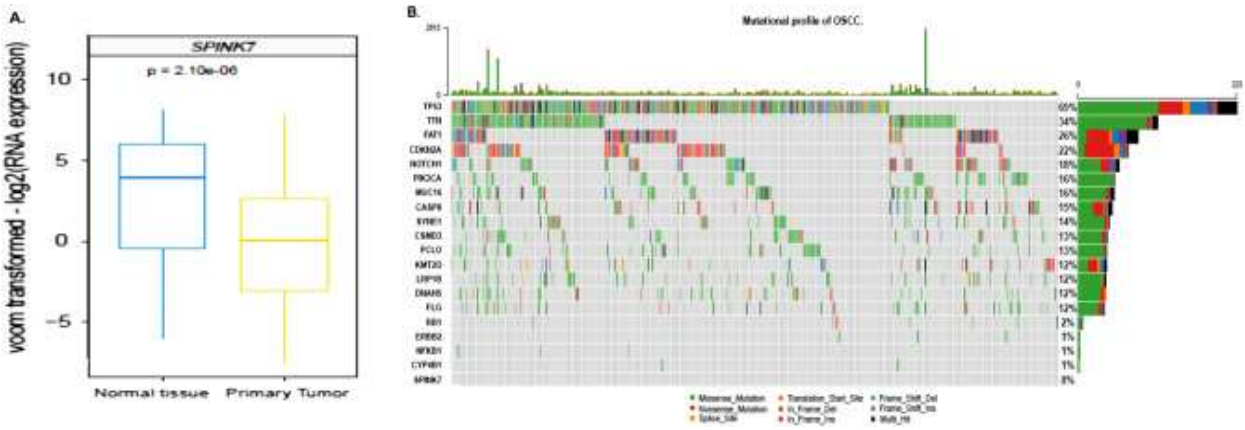


OE3. Correlacionar los niveles de expresión génica y proteica de ECRG2 con el diagnóstico histológico de rutina. Para poder correlacionar la expresión génica con la presencia de la proteína ECRG2 con el diagnostico anatomo-patológico, se analizaron 6 cortes de biopsias representativas de cada grupo (displasia y OSCC) mediante inmunohistofluorescencia. Se evaluó por microscopia confocal tanto la presencia como abundancia proteica en los tejidos, mediante análisis por microscopía confocal y posterior cuantificación con el software ImageJ (NIH, USA). Observamos que la proteína ECRG2 estaba significativamente disminuida en el grupo de OSCC comparados con el grupo displasia ($p<0.005$), siendo esto más evidente en los casos de peor pronóstico.

OE4. Correlacionar los niveles de expresión génica y proteica de ECGR2 con la presencia/ausencia y/o abundancia de las proteínas EGFR, β-Catenina, TP53 y RB1. Se analizó y correlacionó la expresión génica con la presencia de las proteínas EGFR, β-Catenina, P53 y RB1. Se analizaron 6 cortes de biopsias representativas de cada grupo (displasia y OSCC) mediante inmunohistofluorescencia y posterior análisis por microscopia confocal. Observamos que la abundancia de las proteínas EGFR, β-Catenina, P53 y RB1estaban significativamente disminuidos en el grupo de OSCC comparados con el grupo displasia ($p<0.005$), siendo esto más evidente en los casos de peor pronóstico. Respecto de β-Catenina total y β-Catenina activa, independiente del diagnóstico no se observaron cambios significativos ($p=0.82$) por lo que no se incluyeron en el estudio. (Fig 4-5, adaptado de Pennacchiotti et al, doi: 10.1038/s41598-021-86208-z).



OE5. Evaluar mediante análisis *in silico* en el atlas de cáncer (canceratlas.cancer.org) los cambios reportados para ECRG2 y comparar con nuestra población de estudio. Se analizó una cohorte de 330 pacientes con cáncer oral provenientes del cáncer atlas TGCA del NIH de U.S.A para la expresión génica de ECRG2 y se comparó con sujetos sanos viendo los mismos resultados de una disminución significativa en su expresión al igual que en nuestra población de estudio (Fig 3, adaptado de Pennacchiotti et al, doi: 10.1038/s41598-021-86208-z). También se realizó un análisis de perfil de mutaciones para los genes evaluados y a excepción de ECRG2 que no mostro mutaciones reportadas a la fecha, el resto si presentaban siendo TP53 la que mayor frecuencia de mutaciones presento en biopsias de pacientes con OSCC (Fig 3, adaptado de Pennacchiotti et al, doi: 10.1038/s41598-021-86208-z).



En base a estos resultados concluimos que los cambios observados para ECRG2 (SPINK7), acompañados de HER2/neu, P53 y RB1; permiten estadificar a nivel molecular lesiones potencialmente malignas orales. La evaluación de estos genes podría ser de utilidad para clasificar a nivel molecular el estadio de las lesiones y acompañar de manera más asertiva el análisis histopatológico.

Del presente estudio pudimos obtener resultados significativos y novedosos que permitieron entender y generar nueva evidencia científica de la biología tumoral del OSCC. Parte de estos resultados se enviaron a la revista científica indexada **Scientific Reports de Nature:** "Gina Pennacchiotti, Fabio Valdés-Gutiérrez, Wilfredo Alejandro González-Arriagada, Héctor Federico Montes, Judith Maria Roxana Parra, Valeria Andrea Guida, Silvina Esther Gómez, Martin Eduardo Guerrero-Gimenez, Juan Manuel Fernandez-Muñoz, Felipe Carlos Martin Zoppino, Rubén Walter Carón, Marcelo Eduardo Ezquer, Ricardo Fernández-Ramires & Flavia Alejandra Bruna. **SPINK7 (ECRG2) expression changes accompanied by HER2, P53 and RB1 can be relevant in predicting oral squamous cell carcinoma at a molecular level.** Sci Rep, 2021". doi: 10.1038/s41598-021-86208-z.

DIFICULTADES ENCONTRADAS EN LA INVESTIGACIÓN

Algunos reactivos aumentaron significativamente su costo en base a las nuevas políticas económicas y por disposición de la ANMAT las demoras en importaciones se han incrementado. Esto retrasó un poco los tiempos de desarrollo de los experimentos.

Debido a la pandemia de COVID-19 y la cuarentena obligatoria (28/03/2020), asistimos al laboratorio en períodos cortos y por turno, lo que retrasa el procesamiento de las

muestras y posterior análisis de los resultados del laboratorio. Los experimentos que se alcanzaron a cerrar se analizaron y cuantificaron y son los resultados aquí expuestos. Resta analizar y procesar el total de las muestras que se irá haciendo de manera paulatina en los próximos meses cuando de acuerdo con el cronograma y autorizaciones dispuesta por parte de CONICET, Universidad Nacional de Cuyo y el gobierno de Mendoza. Por lo pronto estamos avanzando con todo lo que pueda ser analizado in sílico (computadora). Respecto del **OE6. Estudiar las vías de señalización del receptor ECGR2 y su vinculación con el factor de crecimiento epidérmico EGF en líneas celulares orales tumorales y no tumorales humanas.** No se pudo concretar debido a la pérdida del equipo ultrafreezer (-80C) institucional, que se rompió en pandemia y se descongeló por completo. En el estaban las líneas celulares de OSCC que lamentablemente no resistieron el cambio brusco de descongelamiento afectando su viabilidad. Los backup están en Chile y por pandemia no se ha podido ir nuevamente para reabastecernos. Por lo que ese objetivo queda pendiente de realizarse por estos motivos hasta que se pueda viajar nuevamente.

REFERENCIAS

1. Flugge, T.; Gaudin, R.; Sabatakakis, A.; Troltzsch, D.; Heiland, M.; van Nistelrooij, N.; Vinayahalingam, S. **Detection of oral squamous cell carcinoma in clinical photographs using a vision transformer**. Sci. Rep. 2023, **13**, 2296.
2. Chinn, S.B.; Myers, J.N. Oral Cavity Carcinoma: **Current Management, Controversies, and Future Directions**. *J. Clin. Oncol*. 2015, **33**, 3269–3276.
3. Hussein AA, Helder MN, de Visscher JG, Leemans CR, Braakhuis BJ, de Vet HCW, Forouzanfar T: **Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review**. *Eur J Cancer* 2017, **82**:115-127.
4. Sathiyasekar AC, Chandrasekar P, Pakash A, Kumar KU, Jaishlal MS: **Overview of immunology of oral squamous cell carcinoma**. (0976-4879 (Print)).
5. Zini A, Czerninski R, Vered Y, Livny A, Sgan-Cohen HD: **Trends of oral and pharyngeal cancer in Israel, by gender, age, ethnic group, and country of origin: 1970–2006**. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 2009, **37**(6):547-554.
6. zur Hausen H: **Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application**. *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(5):342-350.
7. Bano N, Yadav M, Mohania D, Das BC: **The role of NF-kappaB and miRNA in oral cancer and cancer stem cells with or without HPV16 infection**. *PloS one* 2018, **13**(10):e0205518.
8. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML: **Improved Survival of Patients With Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Prospective Clinical Trial**. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2008, **100**(4):261-269.
9. Harsha, C.; Banik, K.; Ang, H.L.; Girisa, S.; Vikkurthi, R.; Parama, D.; Rana, V.; Shabnam, B.; Khatoon, E.; Kumar, A.P.; et al. **Targeting AKT/mTOR in Oral Cancer: Mechanisms and Advances in Clinical Trials**. *Int. J. Mol. Sci*. 2020, **21**, 3285.

10. Almangush, A.; Heikkinen, I.; Makitie, A.A.; Coletta, R.D.; Laara, E.; Leivo, I.; Salo, T. **Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis.** *Br. J. Cancer* 2017, **117**, 856–866.

11. Hussein AA, Forouzanfar T, Bloemena E, de Visscher J, Brakenhoff RH, Leemans CR, Helder MN: **A review of the most promising biomarkers for early diagnosis and prognosis prediction of tongue squamous cell carcinoma**. *British journal of cancer* 2018, **119**(6):724-736.

12. Zini A, Czerninski R, Sgan-Cohen HD: **Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites**. *Journal of oral pathology & medicine* 2010, **39**(4):299-305.

13. Choi S, Myers J: **Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy**. *Journal of dental research* 2008, **87**(1):14-32.

14. Gupta N, Gupta R, Acharya AK, Patthi B, Goud V, Reddy S, Garg A, Singla A: **Changing Trends in oral cancer - a global scenario**. Nepal J Epidemiol 2016, **6**(4):613-619.

15. Markopoulos AK: **Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma**. The Open Dentistry Journal 2012, **6**:126-130.

16. Haws JL, Haws B: **Aerodigestive cancers: oral cancer.** FP essentials 2014, 424:11-17.

17. Bota JP, Lyons AB, Carroll BT**: Squamous Cell Carcinoma of the Lip—A Review of Squamous Cell Carcinogenesis of the Mucosal and Cutaneous Junction**. Dermatologic Surgery 2017, **43**(4):494-506.

18. Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I: **Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. Oral diseases**. 2004, **10**(4):212-216.

19. Petti S: **Lifestyle risk factors for oral cancer**. Oral oncology 2009, **45**(4-5):340-350.

20. Van der Waal I: **Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management**. Oral oncology 2009, **45**(4-5):317-323.

21. Sasahira T, Kirita T: **Hallmarks of Cancer-Related Newly Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma**. Int J Mol Sci 2018, **19**(8):1-8.

22. Zheng LS, Yang JP, Cao Y, Peng LX, Sun R, Xie P, Wang MY, Meng DF, Luo DH, Zou X, Chen MY, Mai HQ, Guo L, Guo X, Shao JY, Huang BJ, Zhang W, Qian CN. **SPINK6 Promotes Metastasis of Nasopharyngeal Carcinoma via Binding and Activation of Epithelial Growth Factor Receptor.** Cancer Res. 2017 Jan 15;77(2):579-589. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1281.

23. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S: **An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors**. Molecular cell 2003, **12**(3):541-552.

24. Bernardes VF, Gleber-Netto FO, Sousa SF, Silva TA, Aguiar MCF: **Clinical significance of EGFR, Her-2 and EGF in oral squamous cell carcinoma: a case control study.** Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2010, **29**(1):40.

25. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, Ji X, Liu W, Huang B, Luo W et al: **Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis.** Genes Dis 2018, **5**(2):77-106.

26. Press MF, Lenz HJ: **EGFR, HER2 and VEGF pathways: validated targets for cancer treatment.** Drugs 2007, **67**(14):2045-2075.

27. Li L-w, Li Y-y, Li X-y, Zhang C-p, Zhou Y, Lu S-H: **A novel tumor suppressor gene ECRG4 interacts directly with TMPRSS11A (ECRG1) to inhibit cancer cell growth in esophageal carcinoma**. BMC cancer 2011, **11**(1):52.

28. Guruprasad B, Tanvir P, Rohan B, Kavitha S, Naik SM, Appaji L: **Paediatric nasopharyngeal carcinoma: an 8-year study from a tertiary care cancer centre in South India**. Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery 2013, **65**(1):131- 134.

29. Nagini S, Letchoumy PV, Thangavelu A, Ramachandran C**: Of humans and hamsters: a comparative evaluation of carcinogen activation, DNA damage, cell proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis in oral cancer patients and hamster buccal pouch carcinomas**. Oral oncology 2009, **45**(6):e31-e37.

30. Bruna F, Arango-Rodríguez M, Plaza A, Espinoza I, Conget P: **The administration of multipotent stromal cells at precancerous stage precludes tumor growth and epithelial dedifferentiation of oral squamous cell carcinoma**. Stem Cell Research 2017, **18**(Supplement C):5-13.

31. Bruna F, Plaza A, Arango M, Espinoza I, Conget P: **Systemically administered allogeneic mesenchymal stem cells do not aggravate the progression of precancerous lesions: a new biosafety insight**. Stem Cell Research & Therapy 2018, **9**(1):137. 8

32. Baird A, Coimbra R, Dang X, Lopez N, Lee J, Krzyzaniak M, Winfield R, Potenza B, Eliceiri BP: **Cell surface localization and release of the candidate tumor suppressor Ecrg4 from polymorphonuclear cells and monocytes activate macrophages**. Journal of leukocyte biology 2012, **91**(5):773-781.

33. Dang X, Podvin S, Coimbra R, Eliceiri B, Baird A**: Cell-specific processing and release of the hormone-like precursor and candidate tumor suppressor gene product, Ecrg4.** Cell and tissue research 2012, **348**(3):505-514.

34. Cheng X, Shen Z, Yang J, Lu S-H, Cui Y: **ECRG2 disruption leads to centrosome amplification and spindle checkpoint defects contributing chromosome instability**. Journal of Biological Chemistry 2008, **283**(9):5888-5898.

35. Woolgar JA, Triantafyllou A: **Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis**. Oral oncology 2009, **45**(4-5):361-385.

36. Dionne KR, Warnakulasuriya S, Binti Zain R, Cheong SC: **Potentially malignant disorders of the oral cavity: current practice and future directions in the clinic and laboratory**. International journal of cancer 2015, **136**(3):503-515.

37. Clevers H: **Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.** Cell 2006, **127**(3):469-480.

38. Toyoshima T, Vairaktaris E, Nkenke E, Schlegel KA, Neukam FW, Ries J: **Cytokeratin 17 mRNA expression has potential for diagnostic marker of oral**

squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2008, **134**(4):515-521.

39. Ray P, M.D., Ph.D., Manach Yannick L, M.D., Riou B, M.D., Ph.D., Houle Tim T, Ph.D.: **Statistical Evaluation of a Biomarker**. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 2010, **112**(4):1023-1040.

ABSTRACT

The oral squamous cell carcinoma (OSCC) has a high morbidity rate in the world. Despite the progress in research and therapy, survival has not improved significantly in the last decades. Several tumor biomarkers have been suggested as predictive for OSCC prognosis with poor outcome.

We studied changes in proteins related with cell cycle, inflammation, metastasis, and metabolism to stratify molecularly oral precancerous and cancerous lesions. Currently, the gold standard of OSCC diagnosis is the biopsy, however, the results are observer-dependent and subjective. Adhesion molecules play a central role in pathogenesis and progression of tumors. Serine Peptidase Inhibitor, Kazal Type 7 (ECRG2, SPINK7) are a family of proteins with inhibitory Serine Peptidase activity. It has been reported that ECRG2 inhibits tumor cell growth, migration, invasion and metastasis promotes cell apoptosis in vitro.

Our aim was to evaluate ECRG2 as a potential molecular biomarker which predicts OSCC stages, compared to: HER2, TP53, RB1, NFKB and CYP4B1, as well to explore their potential therapeutic applications.

We found ECRG2 significantly down regulated at dysplasia and OSCC compared with control group. Meanwhile TP53, RB1, NFKB and CYP4B1 were significantly up regulated at OSCC compared with the others groups. The results obtained by ECRG2 were compared to a cohort of 541 patients from the TGCA database. The analysis showed ECRG2 significantly down regulated in OSCC compared to normal group. Both ECRG2, and EGFR were increased in the highly invasive OSCC group. The differential proteins expression among the stages allowed stratifying the groups to molecular and histological levels correlated with prognosis.

Our results suggest that changes in the expression of ECRG2 can be used to predict the molecular stage of the OSCC lesions. This molecule could be a new “potential” biomarker in order to stratify the patients who respond, or not, to the standard chemotherapy Cisplatin.

ESTUDIO PILOTO DE CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN MUJERES GESTANTES ENTRAS LAS 24 Y 28 SEMANAS CON EL PESO AL NACER DE SUS BEBÉS

Adriana L. Burgueño [d], Marina Inés Curriá [a], María Jimena Cerar [b], Gabriela Rovira [a], Melina Saban [a], Glenda Ernst [c]

[a] Servicio de Endocrinología, Metabolismo, Nutrición y Diabetes, [b] Servicio de Obstetricia, [c] Comité Asesor Científico, Hospital Británico de Buenos Aires.
[d] Laboratorio de Psiconeuroendocrinoinmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. BIOMED - CONICET - UCA

ANTECEDENTES

Numerosos estudios han puesto en evidencia que los recién nacidos con un peso al nacer elevado un mayor riesgo de sufrir complicaciones en el parto y problemas de salud a largo plazo, los más comúnmente estudiados son la diabetes y la obesidad (1–3). Según la hipótesis del origen fetal de la salud y la enfermedad (DOHaD de sus siglas en ingles) el alto peso al nacer puede estar asociado a un mayor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles (2–7). En los últimos años, en los países desarrollados, el número de recién nacidos macrosómicos ha aumentado de un 5-20% a un 15-25% (2,8).

La macrosomía se define como un peso al nacer superior a 4000 g, independientemente de la edad gestacional. La identificación precoz del riesgo de macrosomía es esencial para proporcionar un tratamiento temprano y disminuir los riesgos asociados a la misma durante el parto. Sin embargo, al presente no se realizan intervenciones estandarizadas para el tratamiento de la macrosomía (9); para lo que es de vital importancia determinar los factores predictivos más importantes. La literatura confirma la conexión de ciertas características maternas con una mayor tasa de macrosomía pero los resultados de los estudios son diversos (1,2,4,10). La obesidad materna y la diabetes mellitus se consideran factores independientes de riesgo de macrosomía, lo que también ha sido confirmado mediante metaanálisis (11,12).

Sin embargo, las mujeres con un peso adecuado y sin diabetes mellitus también dan a luz a niños con macrosomía (13), por lo que encontrar un factor predictor del riesgo de macrosomía aparece como un objetivo importante tanto para la salud materna como para la salud futura de la descendencia en riesgo.

Un factor poco explorado pero que posee un rol importante durante la gestación es el del metabolismo lipídico. Durante la gestación, se dan dos cambios esenciales en el metabolismo lipídico de la madre: 1) la acumulación materna de grasa (14) y 2) el aumento de lípidos circulantes (15).

Durante las primeras etapas de la gestación, se observa un aumento de los niveles de insulina y un aumento de la sensibilidad a la misma; debido a su acción lipogénica también se observa un aumento de la disponibilidad de ácidos grasos lo que lleva a un mayor depósito de grasa durante esta etapa del embarazo.

Durante el tercer trimestre de la gestación y favorecido por las hormonas placentarias ocurre un aumento de la actividad lipolítica del tejido adiposo. Lo que produce un aumento de los ácidos grasos libres. Como consecuencia, se produce un deterioro de la sensibilidad a la insulina, que es más marcado en mujeres obesas que en las de normo-peso (16). Se ha descripto que las mujeres con diabetes gestacional presentan un aumento de la resistencia a la insulina y mayores niveles de ácidos grasos libres que mujeres gestantes sanas (17).

A pesar de no estar establecidas las concentraciones circulantes, es conocido que el depósito de lípidos en el feto aumenta exponencialmente con la edad gestacional, alcanzando su pico justo antes del nacimiento (14).

Por otro lado, una hormona que también podría servir como indicadora para el desarrollo de macrosomía es la leptina principalmente por dos motivos: 1) su rol en el desarrollo de insulino- resistencia y 2) su principal sitio de producción es el tejido adiposo. Esta hormona es la encargada de regular la homeostasis energética en el organismo: desde la ingesta de alimentos hasta el modo en que la energía adquirida se acumula y se consume en los distintos tejidos (18). Se ha observado que su concentración plasmática correlaciona positivamente con el índice de masa corporal, el contenido de grasa subcutánea y recientemente se ha reportado que también correlaciona con los niveles de ácidos grasos libres (19).

METODOLOGÍA

El presente estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Británico de Buenos Aires (N°939, Junio 2019). Las pacientes de este estudio fueron reclutadas entre septiembre 2019 y febrero 2020. Su participación fue voluntaria y las participantes leyeron y firmaron el consentimiento informado aprobado por el comité de ética del Hospital.

Los criterios de inclusión fueron mujeres mayores de 18 años, embarazadas de un solo feto. Mientras que los criterios de exclusión fueron diabetes previa al embarazo, hipercolesterolemia familiar y diabetes gestacional.

Con excepción de la medición de ácidos grasos libres y leptina el resto de los parámetros bioquímicos analizados fueron realizados en forma rutinaria en el laboratorio del Hospital. Las muestras de sangre utilizadas para las mediciones de ácidos grasos libres y leptina fueron procedentes de la extracción basal realizada durante la curva de tolerancia a la glucosa (entre las semanas 24-28 de gestación). Para estas determinaciones se utilizaron kits comerciales (Ácidos grasos libres: Cat#SFA-1, Zenbio, NC, USA y leptina: Cat#SEK10221, Sino Biological Inc, Beijing, China).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el test de Mann-Whitney para comparar las distintas variables entre los dos grupos (madres que dieron a luz a niños macrosómicos o no macrosómicos). Se realizaron correlaciones de Spearman para evaluar si existía asociación entre las variables estudiadas. Además, se utilizaron modelos de regresión logística y se calcularon los odds ratio (OR, con intervalos de confianza [IC] del 95%) para evaluar el riesgo asociado a la macrosomía. Los valores p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron utilizando el software Medcalc12.

RESULTADOS

Entre las 29 pacientes incluidas en el estudio, 4 de ellas dieron a luz a niños macrosómicos (13.8%). En esta serie de pacientes, solo una paciente tuvo una curva de glucemia alterada, sin embargo, su hijo fue normopeso (3390 gr).

Entre las enfermedades preexistentes reportadas, 2 de las pacientes presentaban hipotiroidismo y una era asmática. Durante el transcurso de la gestación 3 pacientes desarrollaron preeclampsia y 2 restricción del crecimiento intrauterino (tipo 1).

En la tabla 1 pueden observarse las características generales de la población estudiada clasificadas por la presencia o no de macrosomía al nacimiento. Puede observarse que el índice de masa corporal (IMC) pre-gestacional fue significativamente más elevado entre las madres que dieron a luz bebes macrosómicos (Mann-Whitney, p=0.04), lo mismo se observó para la ganancia de peso durante la gestación que fue significativamente mayor en las madres que tuvieron bebes macrosómicos (p=0.01).

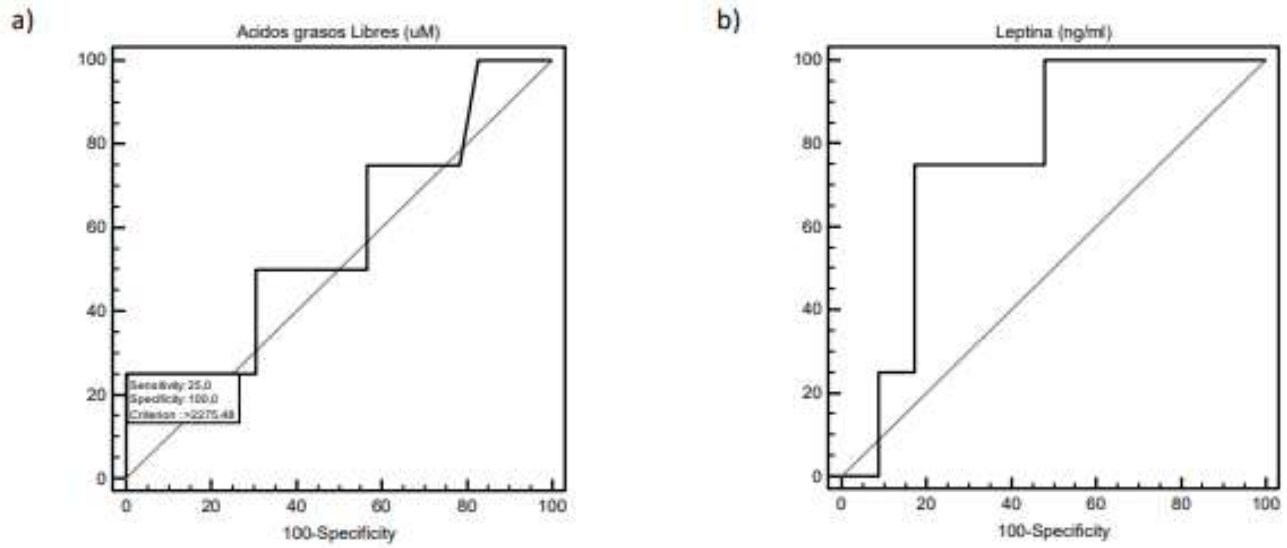
Tabla 1: características generales de las madres gestantes y sus hijos al nacer.

	Madres de neonatos de <4000g (n=25)	**Madres de neonatos de >4000g (n=4)**	
	Media (SD)/mediana [IQ] o n (%)	**Media (SD)/mediana [IQ] o n (%)**	**p**
Características maternas			
Variables continuas			
Edad materna (años)	31,2 (5,7) /32 [27-35]	32,2 (3,3) /32 [29,5-35]	0,88
Altura materna (cm)	163,2 (7,4) /163 [159-168]	165,0 (11,5) /164,0 [157,5-172,5]	0,88
IMC pre-gestacional (kg/m^2)	22,8 (4,3) /22 [21-23]	26,7 (1,5) /27,0 [25,5-28]	0,04
Presión arterial sistólica pre-gestacional (mmHg)	113,6 (10,6) /115 [110-120]	114,2 (8,0) /117 [108,5-120]	0,93
Presión arterial diastólica pre-gestacional (mmHg)	71,9 (9,3) /70 [61-80]	78,5 (2,4) /79,5 [77-80]	0,48

Glucemia basal (mg/dl)	82,4 (5,9) /81 [78-86]	87,5 (8,1) /88,5 [81,5-93,5]	0,28
Glucemia P75 (mg/dl)	101,8 (18,1) /101 [91-112]	117,0 (14,1) /116,0 [107-127]	0,11
Colesterol total (mg/dl)	150,3 (60,4) /153 [101-177]	170,2 (49,7) /184,5 [134,5-206]	0,41
Triglicéridos (mg/dl)	93,4 (27,0) /101 [77-108]	106,7 (30,2) /112 [84-129,5]	0,31
Acidos grasos libres (uM)	1425,9 (476,0) /1340,7 [1026,1-1805,9]	1591,8 (665,9) /1465,2 [1108,0-2075,6]	0,60
Leptina (ng/ml)	31,0 (19,5) /31,9 [16,8-39,9]	50,7 (12,2) /50,1 [42,7-58,8]	0,07
Ganancia de peso durante la gestación	11,1 (5,0)/10 [10-14]	17,5 (3,1) /18,5 [15,5-19,5]	0,01
Variables categóricas y dicotómicas			
IMC			
Bajo peso (<18,5)	3 (12%)	0 (0%)	0,29
Normo peso (18,5-24,9)	17 (68%)	0 (0%)	0,002
Sobrepeso (25-29,9)	2 (8%)	4 (100%)	0,08
Obesidad (>30)	3 (12%)	0 (0%)	0,29

Cabe destacar que los ácidos grasos libres y la leptina no son parámetros habitualmente analizados, debido a esto decidimos realizar curvas ROC para estas variables para determinar cuáles fueron los valores de corte asociados a macrosomía (Figura 1). Para los ácidos grasos libres se determinó un valor mayor de 2274.5 con un área bajo la curva de 58% (IC 95%: 38-77%) con una sensibilidad de 25% (IC95%: 0.6-80.6%) y una especificidad de 100% (IC 95%: 85.2-100%) aunque esta curva al pasar por menos del 50% no sería útil para definir un punto de corte valido. Mientras que la leptina mostró un valor de corte de 45.34 ng/ml con un área bajo la curva de 77.2% (IC 95%: 57-91%) con una sensibilidad de 75% (IC 95%: 19.9-94%) y una especificidad de 82.6% (IC 95%: 61.2-95%) en este caso con una curva adecuada para definir un punto de corte.

Figura 1: Curvas ROC para macrosomía y a) el nivel de ácidos grasos libres o b) el nivel de leptina.



No se halló una correlación lineal entre los niveles de ácidos grasos libres o la leptina con el peso al nacer (Ácidos grasos: Spearman r: 0.15, IC 95%: -0.3-0.5 y leptina: Spearman r: 0.19, IC 95%: -0.2-0.5 respectivamente).

Utilizando los valores de corte obtenidos en las tablas ROC se dicotomizó las variables ácidos grasos libres y leptina, clasificándolas en alto o bajo. De este modo obtuvimos que el Odds Ratio (OR) de presentar altos valores de leptina y tener un hijo macrosómico es de 8.0 (IC 95%: 1,0 - 141,3, p=0.048), esto significa que el tener altos niveles de leptina durante el embarazo aumenta 8 veces la posibilidad de tener un bebe macrosómico. Dado el n tan pequeño, no ha sido posible reproducir este resultado al ajustarlo por variables de confusión como la ganancia de peso y edad gestacional. Entre otros factores que según la bibliografía influyen en el nacimiento de bebés macrosómicos se encuentran el peso corporal pre-gestacional (2,4), el IMC pre-gestacional (4,9), la altura materna (20,21), la edad materna (22), la edad gestacional al nacimiento (23) junto con otros antecedentes más complejos de evaluar.

Dado que en este estudio contamos con pocas pacientes, el IMC pre-gestacional, para el análisis lo clasificamos como con sobrepeso (IMC $\geq$ 25) o sin sobrepeso (IMC < 25), de este modo obtuvimos que el sobrepeso pre-gestacional es un factor de riesgo para el nacimiento de bebes macrosómicos en nuestra muestra, con un OR=33.5 (IC 95% 1.6-722.4, p=0.03), en nuestra población los demás factores mencionados anteriormente no fueron encontrados de riesgo para macrosomía.

El análisis multivariado para determinar los factores de riesgo asociados a la macrosomía mostró que la misma solo se asocia al IMC final de la madre aumentando de manera significativa la posibilidad de tener un bebe macrosómico en 1.4 veces (Tabla 2).

Tabla 2: Análisis multivariado para determinar los factores de riesgo asociados a macrosomía.

Variable	**Odds ratio**	**95% CI**
IMC inicial	0.43	0.14 - 1.3
IMC final	3.5	1.01 – 13.3

DISCUSIÓN

Los resultados aquí presentados muestran el rol nocivo de elevado IMC al final del embarazo sobre el riesgo del nacimiento de bebes macrosómicos, lo que confirma y enfatiza la necesidad de mejorar el estado nutricional de las mujeres antes y durante el embarazo para reducir la aparición de este resultado adverso para el recién nacido.

La literatura muestra relaciones similares entre macrosomía y obesidad/sobrepeso (1,9,12), pero también hay discrepancias (23,24). Las inconsistencias entre los resultados de los estudios pueden ser causadas por una metodología diferente, incluyendo diferentes tamaños de la cohorte, diferentes grupos control o diferentes categorías de referencia, así como diferentes poblaciones analizadas en términos de edad materna, el IMC y los antecedentes obstétricos. En el presente estudio, la incidencia de macrosomía (13.8%) fue similar a los resultados aportados por la literatura (1,4,5,9), con un 31% de mujeres con sobrepeso pre-gestacional. Además, como ya fue mencionado solo 3 pacientes presentaron enfermedades preexistentes (2 hipotiroideas, 1 asmática) mientras que 5 desarrollaron complicaciones relacionadas al embarazo (3 preeclampsia y 2 restricción del crecimiento intrauterino). Debido al bajo n, no pudimos realizar un análisis que discrimine estas enfermedades. Por lo que esperamos a futuro poder ampliar el número de madres incluidas en el estudio y realizar un análisis más profundo de este tipo de factores.

LIMITACIONES

Inicialmente nos planteamos reclutar 100 madres en el estudio, sin embargo, debido a las restricciones impuestas durante la pandemia por COVID-19, nos encontramos con una fuerte disminución de la cantidad de pacientes que se hacían los estudios en el Hospital, prefiriendo centros más cercanos a sus domicilios, por lo que nos vimos imposibilitados de cumplir la meta propuesta de cantidad de pacientes.

CONCLUSIONES

A pesar de que no encontramos un rol de los ácidos grasos libres en el nacimiento de infantes con macrosomía, observamos que sí hay una relación entre los niveles de leptina de las madres y la macrosomía, esto probablemente se deba a las observaciones realizadas sobre el IMC al final del embarazo, debido a que los niveles de leptina están estrechamente relacionados al contenido de tejido adiposo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Akanmode AM, Mahdy H. Macrosomia. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
2. Fang F, Zhang Q-Y, Zhang J, Lei X-P, Luo Z-C, Cheng H-D. Risk factors for recurrent macrosomia and child outcomes. World J Pediatr. 2019 Jun;15(3):289–96.
3. Beta J, Khan N, Khalil A, Fiolna M, Ramadan G, Akolekar R. Maternal and neonatal complications of fetal macrosomia: systematic review and meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2019 Sep;54(3):308–18.
4. Wang D, Hong Y, Zhu L, Wang X, Lv Q, Zhou Q, et al. Risk factors and outcomes of macrosomia in China: a multicentric survey based on birth data. J Matern Fetal Neonatal Med. 2017 Mar;30(5):623–7.
5. Lewandowska M. The role of maternal weight in the hierarchy of macrosomia predictors; overall effect of analysis of three prediction indicators. Nutrients. 2021 Feb 28;13(3).
6. Barker DJ, Fall CH. Fetal and infant origins of cardiovascular disease. Arch Dis Child. 1993 Jun;68(6):797–9.
7. Barker DJ, Martyn CN, Osmond C, Hales CN, Fall CH. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. BMJ. 1993 Dec 11;307(6918):1524–7.
8. Hofstee P, McKeating DR, Bartho LA, Anderson ST, Perkins AV, Cuffe JSM. Maternal selenium deficiency in mice alters offspring glucose metabolism and thyroid status in a sexually dimorphic manner. Nutrients. 2020 Jan 20;12(1).
9. Vinturache AE, Chaput KH, Tough SC. Pre-pregnancy body mass index (BMI) and macrosomia in a Canadian birth cohort. J Matern Fetal Neonatal Med. 2017 Jan;30(1):109– 16.
10. Turkmen S, Johansson S, Dahmoun M. Foetal Macrosomia and Foetal-Maternal Outcomes at Birth. J Pregnancy. 2018 Aug 8;2018:4790136.
11. He X-J, Qin F-Y, Hu C-L, Zhu M, Tian C-Q, Li L. Is gestational diabetes mellitus an independent risk factor for macrosomia: a meta-analysis? Arch Gynecol Obstet. 2015 Apr;291(4):729–35.
12. Dai R-X, He X-J, Hu C-L. Maternal pre-pregnancy obesity and the risk of macrosomia: a meta- analysis. Arch Gynecol Obstet. 2018 Jan;297(1):139–45.

13. Usta A, Usta CS, Yildiz A, Ozcaglayan R, Dalkiran ES, Savkli A, et al. Frequency of fetal macrosomia and the associated risk factors in pregnancies without gestational diabetes mellitus. Pan Afr Med J. 2017 Feb 2;26:62.

14. Herrera E, Ortega-Senovilla H. Maternal lipid metabolism during normal pregnancy and its implications to fetal development. Clin Lipidol. 2010 Dec;5(6):899–911.

15. Alvarez JJ, Montelongo A, Iglesias A, Lasunción MA, Herrera E. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. J Lipid Res. 1996 Feb;37(2):299–308.

16. Sivan E, Chen X, Homko CJ, Reece EA, Boden G. Longitudinal study of carbohydrate metabolism in healthy obese pregnant women. Diabetes Care. 1997 Sep;20(9):1470–5.

17. Sivan E, Boden G. Free fatty acids, insulin resistance, and pregnancy. Curr Diab Rep. 2003 Aug;3(4):319–22.

18. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature. 1998 Oct 22;395(6704):763–70.

19. der Merwe MT, Panz VR, Crowther NJ, Schlaphoff GP, Gray IP, Froguel P, et al. Free fatty acids and insulin levels--relationship to leptin levels and body composition in various patient groups from South Africa. Int J Obes Relat Metab Disord. 1999 Sep;23(9):909–17.

20. Marshall NE, Biel FM, Boone-Heinonen J, Dukhovny D, Caughey AB, Snowden JM. The Association between Maternal Height, Body Mass Index, and Perinatal Outcomes. Am J Perinatol. 2019 May;36(6):632–40.

21. Monasta L. Maternal height should be considered in the evaluation of macrosomia related risk of infant injuries at birth. Acta Obstet Gynecol Scand. 2011 Feb;90(2):198; author reply 198- 9.

22. Lewandowska M, Sajdak S, Więckowska B, Manevska N, Lubiński J. The influence of maternal BMI on adverse pregnancy outcomes in older women. Nutrients. 2020 Sep 16;12(9).

23. Araujo Júnior E, Peixoto AB, Zamarian ACP, Elito Júnior J, Tonni G. Macrosomia. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2017 Jan;38:83–96.

24. Denguezli W, Faleh R, Fessi A, Yassine A, Hajjaji A, Laajili H, et al. Risk factors of fetal macrosomia: role of maternal nutrition. Tunis Med. 2009 Sep;87(9):564–8.

DETECCIÓN DE TOXINAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DE PORTADORES NASALES Y GENOTIPIFICACIÓN

Fernanda Buzzola

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica.
IMPaM - UBA - CONICET

Durante el período de ejecución del subsidio se lograron completar los objetivos específicos propuestos en el plan de investigación. A continuación, se muestran los logros alcanzados.

OBJ. ESP. 1

Caracterizar los aislamientos de *Staphylococcus aureus* en cuanto a la presencia de SCCmec y perfil de resistencia antibiótica.

Se estudiaron 64 cepas de *S. aureus* aislados a partir de hisopados nasales de acuerdo al procedimiento profiláctico estándar a la admisión hospitalaria del paciente. Los individuos no presentaron historia previa de infección por *S. aureus* dentro del año anterior a la admisión. La especie se confirmó mediante detección por PCR del gen 16S específico para *S. aureus*.

A cada cepa se le realizó el antibiograma para los siguientes antibióticos: penicilina (PEN), oxacilina (OXA), eritromicina (ERI), clindamicina (CLI), trimetroprima-sulfametoxazol (TMS), levofloxacina (LEV), gentamicina (GEN), rifampicina (RFA), minociclina (MIN) y cloramfenicol (CMP). La cepa ATCC 25923 se utilizó como control. Para la interpretación de los antibiogramas se siguieron las normas del CLSI: M100-ED28 (Clinical and Laboratory Standars Institute). A continuación, se listan los resultados:

PEN: 87.5 % (56/64) resistentes
OXA: 20.3 % (13/64) resistentes
ERI: 12.5 % (8/64) resistentes
CLI: 9.3 % (6/64) resistentes
TMS: 0 % resistentes
LEV: 6.2 % (4/64) resistentes

GEN: 9.3 % (6/64) resistentes
RFA: 0 % resistentes
MIN: 0 % resistentes
CMP: 0 % resistentes

Del total de cepas estudiadas, 4 cepas presentaron resistencias a 4 o más antibióticos y otras 4 cepas mostraron ser resistentes a 3 antibióticos.

Mediante PCR se detectó el gen *mecA* en las 13 cepas OXA resistentes. Por otro lado, se identificaron en este grupo de cepas los tipos de cassette cromosómico *mec* (SCC*mec*) de *Staphylococcus* hallándose 6 cepas con SCC*mec*I y 7 cepas con SCC*mec*IV.

OBJ. ESP. 2

Detectar los genes para las toxinas (*sea-see*, *eta*, *etb*, *tsst*, *seg-sej*, EDINA-C, ETD, *pvl*, *hla*, *hlb*).

Para el total de cepas estudiadas se detectaron los genes de las toxinas mediante PCRs específicas según lo especificado en la metodología. Los resultados obtenidos son:

PVL (*lukS*-PV/*lukF*-PV): 3.1% cepas positivas

TSST-1 (*tst*): 21.8 % cepas positivas

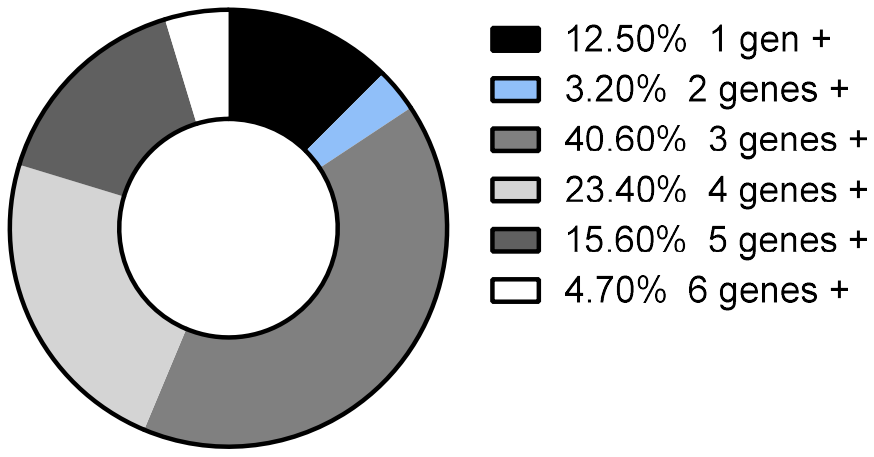
Exfoliatina A y B (*eta* y *etb*): 1.5% y 0% cepas positivas, respectivamente

Enterotoxinas: *sea* (15.6%), *seb* (12.5%), *sec* (6.2%), *sed* (1.5%), *see* (1.5%), *seg* (76.5%), *seh* (6.2%), *sei* (78.1%), y *sej* (3.1%) cepas positivas

EDIN: A (0%), B (3.1%) y C (3.1%) cepas positivas

ETD: 3.1% cepas positivas

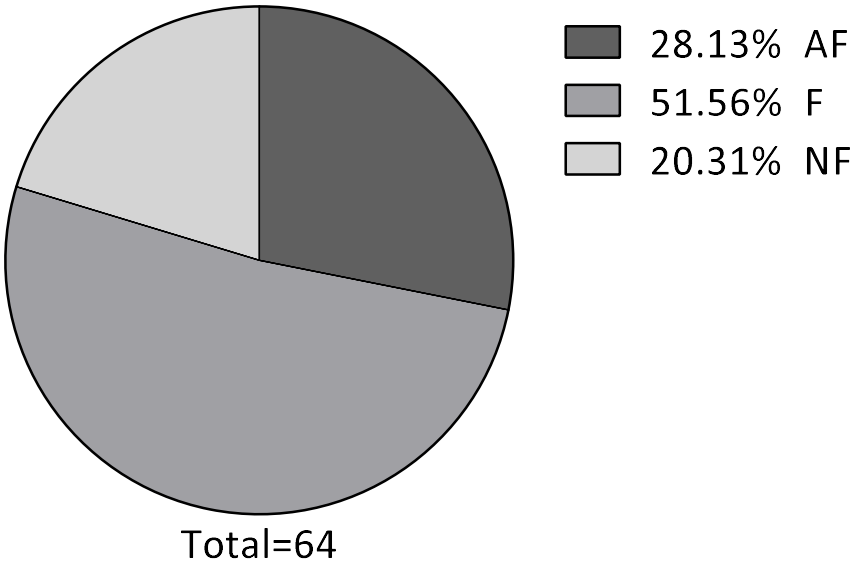
Todas las cepas presentaron al menos 1 gen de toxinas. El 79.6% (51/64) de las cepas fueron positivas para 3, 4 ó 5 genes de toxinas. El 20.4% restante presentó 1, 2 ó 6 genes de toxinas. La Figura representa el porcentaje de cepas positivas para 1 a 6 genes de toxinas.



OBJ. ESP. 3

Establecer la capacidad de los aislamientos de *S. aureus* para formar biopelícula *in vitro*.

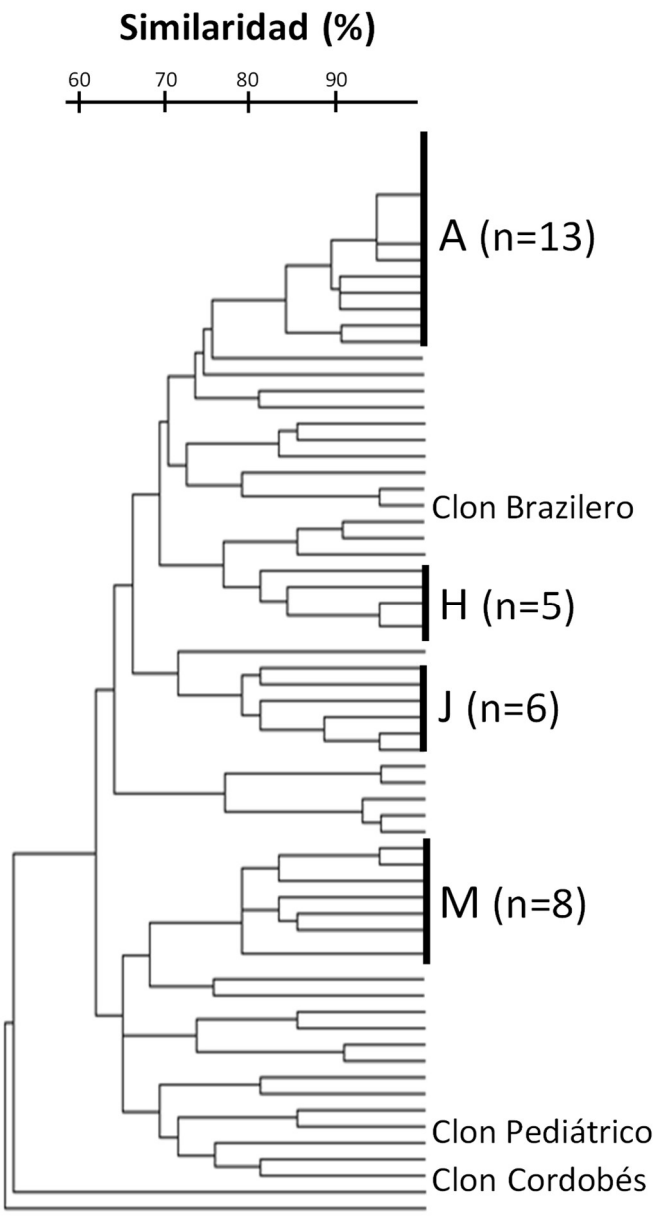
Mediante la técnica de cristal violeta se cuantificaron espectrofotométricamente las biopelículas formadas durante 24 h a 37ºC. El análisis de los cuartiles permitió clasificar el total de los aislamientos en Altos Formadores (AF) (valores de DO > 0.40), Formadores (F) (valores de DO entre 0.13 – 0.40) o No Formadores (NF) (valores de DO < 0.13) de biopelícula. El siguiente gráfico representa el porcentaje de aislamientos según la capacidad para formar biopelícula *in vitro*.



OBJ. ESP. 4

Genotipificar los aislamientos de *S. aureus* por medio de la obtención de los pulsotipos, *spa* tipos y *agr* tipos.

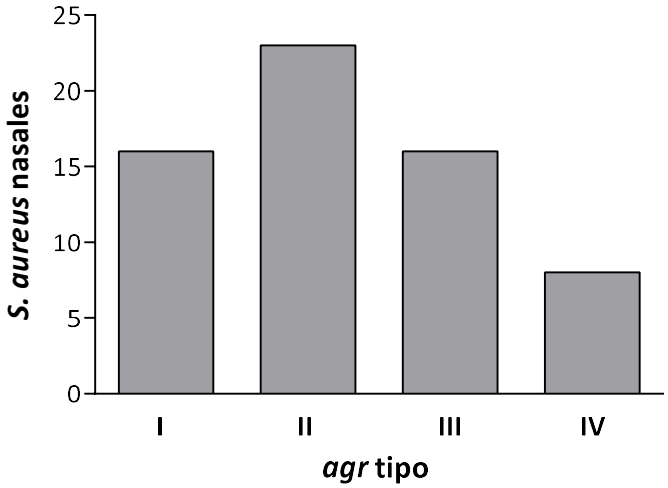
La genotipificación se determinó por medio de electroforesis en campos pulsados (PFGE) de los fragmentos de ADN digeridos con *SmaI* utilizando el aparato CHEF-DR-II. La similitud entre los pulsotipos se evaluó por el coeficiente de Dice. Las matrices de similitud resultante se agruparon utilizando el programa TREECON para generar el árbol genealógico.



Los aislamientos nasales de *S. aureus* estudiados mostraron una alta diversidad clonal mediante la pulsotipificación. Considerando una similitud del 85% se establecieron 19 pulsotipos diferentes. Treinta y dos aislamientos fueron agrupados en 4 pulsotipos (A, H, J y M) mayoritarios. Los aislamientos restantes estuvieron distribuidos en pulsotipos individuales (2-3 cepas por tipo).

Mediante la amplificación de la región variable X del gen *spa* y posterior secuenciación se asignaron los *spa* tipos mediante la base Ridom SpaServer (http://spa.ridom.de). El análisis reveló la presencia de 47 *spa* tipos diferentes entre los aislamientos estudiados. Siendo los más frecuentes los tipos t002 (n=7), t012 (n=4), t021 (n=3), t149 (n=3), t065 (n=2), t148 (n=2), t645 (n=2) y t8715 (n=2).

Los *agr* tipos se determinaron por amplificación múltiple por PCR. Los cuatro tipos de *agr* (I, II, III y IV) fueron encontrados entre la población de *S. aureus* nasales. La figura siguiente muestra la frecuencia de distribución obtenida de los *agr* tipos. Para el conjunto de aislamientos estudiados, se determinó un 26% (16 cepas), 35% (22 cepas), 26% (16 cepas) y 13% (8 cepas) para los *agr* tipo I, II, III y IV, respectivamente.



El conjunto de resultados obtenidos del estudio de la población de *S. aureus* proveniente de portadores nasales asintomáticos permite concluir que:

- Se detectó el gen *mecA* en las 13 cepas oxacilina resistentes. Hallándose 6 cepas con SCC*mec*I y 7 cepas con SCC*mec*IV.
- Se estableció que 4 cepas presentaron resistencias a 4 o más antibióticos y otras 4 cepas mostraron ser resistentes a 3 antibióticos.
- El 79.6% (51/64) de las cepas fueron positivas para 3, 4 ó 5 genes de toxinas. Todas las cepas presentaron al menos 1 gen de toxina.
- El 79,7% de las cepas posee buena y alta capacidad para formar biopelícula *in vitro*.
- La genotipificación molecular permitió poner en evidencia la gran diversidad clonal entre los aislamientos nasales.

Estos hallazgos enfatizan la importancia de determinar el estado de portación nasal de *S. aureus* al momento de la admisión hospitalaria para prevenir infecciones de origen endógeno por este patógeno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Walsh AL, Fields AC, Dieterich JD, Chen DD, Bronson MJ, Moucha CS. Risk Factors for *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization in Joint Arthroplasty Patients. J Arthroplasty. 2018 May;33(5):1530-1533.
2. Fisher EL, Otto M, Cheung GYC. Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. Front Microbiol. 2018 Mar 13;9:436.
3. Udo EE, Boswihi SS. Antibiotic Resistance Trends in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated in Kuwait Hospitals: 2011-2015. Med Princ Pract. 2017;26(5):485-490.
4. Dotto C, Lombarte Serrat A, Cattelan N, Barbagelata MS, Yantorno O, Sordelli DO, Ehling-Schulz M, Grunert T and Buzzola FR. The active component of aspirin, salicylic acid, promotes Staphylococcus aureus biofilm formation in a PIA-dependent manner. Frontiers Microbiol (2017) 8:4.
5. Goerke C, Kümmel M, Dietz K, Wolz C. Evaluation of intraspecies interference due to agr polymorphism in Staphylococcus aureus during infection and colonization. J Infect Dis. 2003 Jul 15;188(2):250-6.

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the molecular epidemiological characteristics and biofilm formation of nasal *S. aureus* strains from Argentina. The study revealed varying levels of resistance among the isolates: 87.5% were resistant to penicillin, 20.3% to oxacillin, and 12.5% to erythromycin. Oxacillin-resistant isolates carried SCCmecI or SCCmecIV. All strains possessed at least 1 toxin gene. 79.6% of the strains tested positive for 3, 4, or 5 toxin genes. 79.7% of the strains displayed good to high capacity for biofilm formation. It were identified 19 different pulsotypes, with the major ones being A, H, J, and M, comprising 51% of the isolates. The most common *spa* types were t002, t012, t021, t149, t065, t148, t645, and t8715. Interestingly, the distribution of *agr* types showed an unusual finding, with 16, 22, 16, and 8 strains belonging to agr types I, II, III, and IV, respectively. Notably, *agr* type IV is typically rare to find. In summary, the study observed the presence of a predominant pulsotype and revealed significant clonal diversity through *spa* and *agr* typing. The high biofilm-forming ability of these isolates has implications for the efficacy of antimicrobial and decolonization treatments. Additionally, 23% of the isolates were methicillin-resistant, underscoring the importance of determining the nasal carriage status of *S. aureus* upon hospital admission to prevent endogenous infections caused by this pathogen. These findings contribute to a better understanding of *S. aureus* epidemiology and its implications for clinical practice in Argentina.

RELEVANCIA CLÍNICA DE LA EXPRESIÓN DE PDCD4 EN CÁNCER DE MAMA

Rosalía I. Cordo Russo [1], Santiago Madera [1], Matías G. Pereira [1,2], María F. Chervo [1], Violeta A. Chiauzzi [1], Roxana Schillaci [1], Ernesto Gil Deza [3], Patricia V. Elizalde [1]

[1] Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME - CONICET.
[2] Unidad de Patología Mamaria, Hospital General de Agudos Juan A. Fernández.
[3] Instituto Oncológico Henry Moore

INTRODUCCIÓN

El **cáncer de mama** (CM) es una enfermedad con efectos devastadores en la salud global. Según el Ministerio de Salud de la Nación, el CM es la primera causa de muerte por tumores en mujeres, registrándose cerca de 5.500 muertes por esta enfermedad anualmente. Si bien en los países desarrollados la incidencia ha disminuido en los últimos años, en los países subdesarrollados ha aumentado debido a la escasa prevención, la falta de controles periódicos y el diagnóstico tardío.

El diagnóstico del CM se lleva a cabo a través de estudios histopatológicos sobre la biopsia del paciente que incluyen la determinación de los receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), la expresión ErbB-2/HER2 en la membrana, y la evaluación de la tasa proliferativa (ki67). En base a estas determinaciones y siguiendo las normas del Consenso de Saint Gallen 2017, el CM es clasificado en cinco subtipos clínicos que incluyen:- "receptor de hormonas positivo (RH+) y HER2-negativo (-): luminal A-like (RE+, RP+, HER2-, Ki-67 bajo); -"RH+ y HER-2-: luminal B-like (RE+, PR- o bajo, HER2-, Ki-67 alto); -"RH+ y HER2+" (RE+, RP+ o -, HER2+); -"RH- y HER2+" (RE-, RP-, HER2+); y -"Triple negativo" (RE-, RP- y HER2-) (1). Los tumores de origen luminal (cerca del 70%) comparten la expresión del RE, un marcador de pronóstico muy importante en CM, el cual posee una terapéutica específica que es la terapia hormonal (2). También es conocido que los progestágenos y el RP juegan un rol importante en la tumorigénesis mamaria (3). Aunque la mayoría de las pacientes del subtipo Luminal-like responden a las terapias endocrinas, algunas (en su mayoría con tumores clasificados dentro del subtipo Luminal B-like) desarrollan recaídas. Los tumores del subtipo Luminal A-like expresan altos niveles del RE y del RP, típicamente son de grado tumoral bajo, y presentan una baja fracción proliferativa (dada por la determinación de Ki67). En contraposición, los tumores del subtipo Luminal B-like expresan bajos o nulos niveles del RP, típicamente son de grado tumoral alto, y poseen una fracción proliferativa alta (1). Cerca del 15% de los CM son ErbB-2/HER2-positivos, un subtipo particularmente agresivo de mal pronóstico y con abordajes terapéuticos que, a pesar de su efectividad, han mostrado porcentajes significativos de resistencia (4). Asimismo, el CM triple negativo representa un 12-17% de los CM, se asocia a un curso más agresivo y peor evolución clínica (5) y no posee una terapia específica, siendo el tratamiento recomendado la quimioterapia.

PDCD4 (*programmed cell death 4*) es un gen supresor tumoral que se encuentra disminuido en cáncer. La expresión de PDCD4 se ha reportado luego del inicio de la apoptosis, sugiriendo que su pérdida confiere propiedades anti-apoptóticas. PDCD4 ejerce su rol de gen supresor a través de la inhibición de la actividad helicasa del factor eucariótico de iniciación de la traducción elF4A y subsecuentemente la inhibición de traducción de proteínas (6). Asimismo actúa como gen supresor de metástasis dado que inhibe la transcripción del receptor del activador del plasminógeno de tipo uroquinada (uPAR) y la invasión tumoral. También inhibe la invasión de células de CM por inducción del inhibidor tisular de la metaloproteasa-2, enzima que interviene en el remodelado tisular requerido para la diseminación metastásica, y por inhibición de la enzima lisil oxidasa (LOX) (7). PDCD4 se expresa tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células de la glándula mamaria normal, y disminuye en ambos compartimientos a medida que el tejido se maligniza (8). Es interesante destacar que, hasta el momento, no se ha evaluado el valor pronóstico de la expresión de PDCD4 en CM, ya sea en el núcleo o en el citoplasma. Reportes previos de nuestro laboratorio revelaron un mecanismo novedoso de modulación de PDCD4 en células de CM ErbB-2-positivo. Hemos demostrado que la función nuclear de ErbB-2 como regulador transcripcional aumenta los niveles del microARN-21 y promueve la metástasis del CM. El aumento del microARN-21 inhibe los niveles de PDCD4 dado que PDCD4 es uno de sus genes blanco más conocidos. Asimismo, revelamos que la falta de PDCD4 está correlacionada con la metástasis ganglionar en biopsias de CM ErbB-2-positivo (9).

En este trabajo se exploró la relevancia clínica de la expresión de PDCD4, tanto a nivel nuclear como citoplasmático, en biopsias de pacientes con CM. Asimismo, se investigó el rol de PDCD4 como biomarcador de pronóstico en los distintos subtipos de CM.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes.

Los estudios fueron realizados en biopsias embebidas en parafina de mujeres con carcinomas mamarios invasivos. Los Comités de Ética en Investigación de las siguientes instituciones revisaron y aprobaron la colección de especímenes tumorales, la recopilación de datos clínicos y patológicos de los pacientes, así como el análisis retrospectivo de biomarcadores en especímenes anonimizados provenientes de sus cohortes archivadas: Universidad de La Frontera - Hospital de Temuco (Chile), Hospital de Agudos “Juan A. Fernández” (Buenos Aires, Argentina), y Hospital Aeronáutico Central (Buenos Aires, Argentina). Los datos y muestras de las pacientes del Hospital de Temuco (Chile) fueron provistos por los Dres. JC Roa y P Guzmán. Los datos y muestras de las pacientes del Hospital Fernández fueron provistos por los Dres. Sabrina Barchuck, Silvina Figurelli, y Daniel López Della Vecchia. Los datos y muestras de las pacientes del Hospital Aeronático fueron provistos por el Dr. Ernesto Cortese. El estudio fue realizado de acuerdo con las reglamentaciones legales y éticas establecidas en la resolución de ANMAT 6677/10, la resolución 1480/11 del Ministerio de Salud de la Nación, y sus modificaciones; y las regulaciones internacionales vigentes (incluyendo el Código de Nuremberg y la Declaración de Helsinski). Se obtuvieron los consentimientos informados por escrito de todos los pacientes previo a su incorporación en el estudio. El estado de los pacientes antes del tratamiento fue clasificado de acuerdo al sistema del American Joint Committee on Cancer (USA) (10). Para la determinación del grado histológico se utilizó el sistema de Elston y Ellis (11). Los criterios preestablecidos de

inclusión para el estudio de PDCD4 fueron: mujeres de 18–85 años (vivas o difuntas) diagnosticadas con CM como tumor primario, en estadios I-III, cuyo seguimiento estuviera completo. Las pacientes atravesaron tratamiento quirúrgico, recibieron quimioterapia adyuvante con antraciclina, taxanos, y/o componentes de platino. Los datos clinicopatológicos de la cohorte se muestran en el *Anexo 1*. Los puntos finales de evaluación fueron: sobrevida global; sobrevida libre de enfermedad (tiempo desde el diagnóstico hasta la detección de recurrencia o muerte, lo que ocurra primero); sobrevida libre de metástasis (tiempo desde el diagnóstico hasta la detección de recurrencia de metástasis a distancia o local; "local" comprende la aparición de tumor en la región del nódulo linfático o piel o mama del mismo lado que la mama donde ocurrió el tumor original: "región ipsilateral"; "a distancia" comprende las regiones más allá de la región de la mama ipsilateral incluyendo cerebro y sistema nervioso central, riñón, pulmón, hueso, pleura o peritoneo, y nódulos supraclaviculares). Los pacientes fueron anonimizados para realizar este estudio.

Inmunohistoquímica (IHQ).

La técnica de IHQ fue realizada cual lo detallado anteriormente en cortes de parafina de 5 μm de espesor (12). La presencia de PDCD4 se investigó utilizando el anticuerpo (Ac) anti-PDCD4 (clon D29C6, Cell Signaling Tech.) seguido por tinción con Ac secundario conjugado a biotina y un sistema de amplificación ABC (Vector). La presencia de PDCD4, en el citoplasma y núcleo celular fue puntuada siguiendo la puntuación ya descripta en el laboratorio (9, 12, 13).

Análisis estadístico.

Se utilizaron los programas SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL) y GraphPad Prism 6 (GraphPad). Las probabilidades acumuladas de sobrevida se calcularon según el método de Kaplan-Meier y la significación estadística se analizó mediante log-rank test. Se realizaron análisis univariados y multivariados utilizando modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Las variables que eran estadísticamente significativas en el modelo univariado se incluyeron en el análisis multivariado. Se calculó el cociente de riesgo (CR) y el IC 95%. Todos los análisis estadísticos fueron de dos colas, y un P valor inferior a 0.05 ($P< 0.05$) fue considerado significativo.

RESULTADOS

La expresión de PDCD4 nuclear está asociada con un pronóstico clínico más favorable en CM.

Con el objetivo de explorar la relevancia clínica de PDCD4, tanto a nivel nuclear como citoplasmático, realizamos un estudio retrospectivo en una cohorte de 619 pacientes con cáncer de mama invasivo primario. La expresión de PDCD4 fue estudiada por inmunohistoquímica (IHQ). La expresión de PDCD4 nuclear (NPDCD4) fue puntuada considerando el porcentaje de células positivas y la intensidad de la tinción según lo descripto previamente (9, 12). Un puntaje de 0 representa ausencia de tinción en núcleos, 1+ corresponde a una tinción débil en el 1-30% de los núcleos, 2+ moderada tinción en el 31-70% de los núcleos y 3+ tinción fuerte en >70% de los núcleos. La expresión de PDCD4 citoplasmática (CPDCD4) fue puntuada de acuerdo con la intensidad de la tinción (score 0, negativo; score 1+, tinción débil; score 2+, tinción moderada; score 3+, tinción intensa) (12,13). En la figura 1a se muestran imágenes representativas de las

distintas puntuaciones. En paralelo, se tiñeron controles positivos y negativos (Fig. 1b). Aquellas muestras cuya puntuación fue scoreada como 2+ y 3+ fueron consideradas como positivas para la expresión de NPDCD4 y de CPDCD4. Al analizar la presencia de PDCD4 en nuestras cohortes observamos que la mayoría de los CM invasivos en nuestra cohorte (367 de 619, 59.3%) carecían de NPDCD4 y CPDCD4. Dentro de los 619 tumores analizados, 215 fueron positivos para NPDCD4 (34.7%) y 132 positivos para CPDCD4 (21.3%). La positividad de NPDCD4 se encontró asociada con un estadio clínico más bajo (P = 0.00026), tumores más diferenciados (P = 6.43x10-6) y con la expresión del receptor de estrógenos (RE) y del receptor de progesterona (RP) (P = 9.15x10-9 y P = 2.76x10-9, respectivamente). La pérdida de NPDCD4 se asoció con un mayor tamaño tumoral (P = 1.80x10-6). Por otro lado, la expresión de CPDCD4 sólo se encontró asociada con la expresión del RE y de RP (P = 0.033 y P = 0.001, respectivamente).

Figura 1

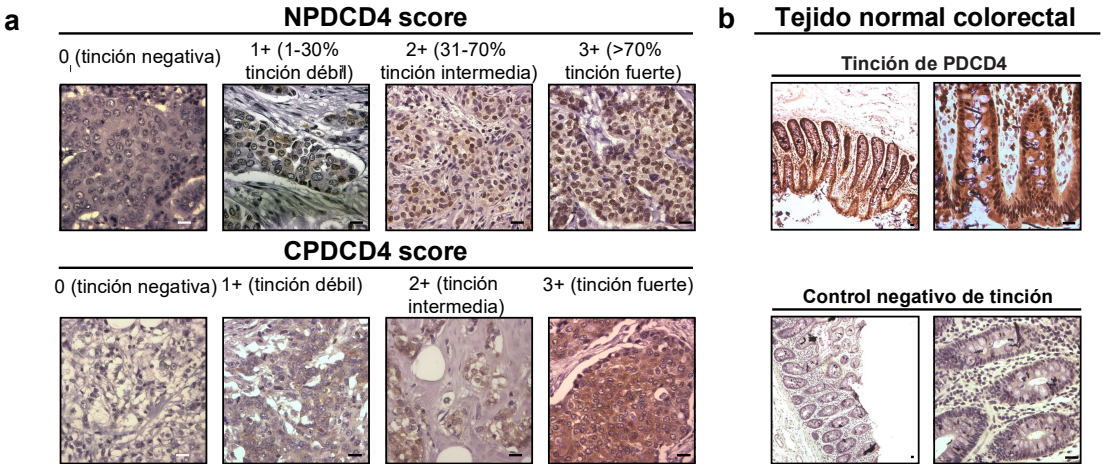


Figura 1: Expresión de PDCD4 evaluada por IHQ. **(a)** Los niveles de expresión de NPDCD4 y CPDCD4 en muestras de cáncer de mama invasivo primario fueron evaluados por IHQ y puntuado considerando el porcentaje de células positivas y/o la intensidad de la tinción (9,12,13). Se muestran imágenes representativas de tumores con scores de 0 a 3+. **(b)** Controles positivos y negativos de tinción de PDCD4. Imágenes representativas de tejido normal colorrectal, usado como control positivo de tinción (13). Se realizó control negativo reemplazando el anticuerpo anti-PDCD4 por un anticuerpo de isotipo IgG no específico. Barra = 20µm

Luego, exploramos la relevancia clínica de la expresión de NPDCD4 o CPDCD4 en CM. El análisis de sobrevida de Kaplan-Meier (KM) reveló que los pacientes con CM que tenían tumores que expresaban NPDCD4 mostraron una sobrevida global (SG) y una sobrevida libre de enfermedad (SLE) significativamente más altas en comparación con aquellos pacientes cuyos tumores carecían de NPDCD4 (Fig. 2a). La sobrevida libre de metástasis a distancia (SLM), pero no la sobrevida libre de recaída local (SLRL), fue significativamente mayor en los tumores NPDCD4 positivos que en los tumores NPDCD4 negativos (Fig. 2a). Por otro lado, el análisis KM mostró que CPDCD4 sólo se correlacionó con un OS más alto en CM (Fig. 2a). El análisis de Cox univariado reveló que mientras NPDCD4 estaba asociado con una sobrevida global y una sobrevida libre de enfermedad más prolongada, la expresión de CPDCD4 sólo se encontró asociada con la sobrevida global (Fig. 2b). El mayor tamaño tumoral, el estadio de los ganglios linfáticos, el estadio clínico, el grado tumoral y la ausencia de expresión de RE y RP se encontraron asociados con un resultado clínico desfavorable en el análisis de Cox univariado (Fig. 2b). El análisis multivariado utilizando el modelo de Cox de múltiples

riesgos, ajustado por el grado tumoral, el estadio clínico y el status del RE y RP, demostró que la positividad de NPDCD4 es un predictor independiente de sobrevida global y sobrevida libre de enfermedad más prolongada en CM (Fig. 2c). Nuestros hallazgos revelan que NPDCD4, pero no CPDCD4, está asociado con un fenotipo menos agresivo y mejor pronóstico clínico en CM.

Figura 2

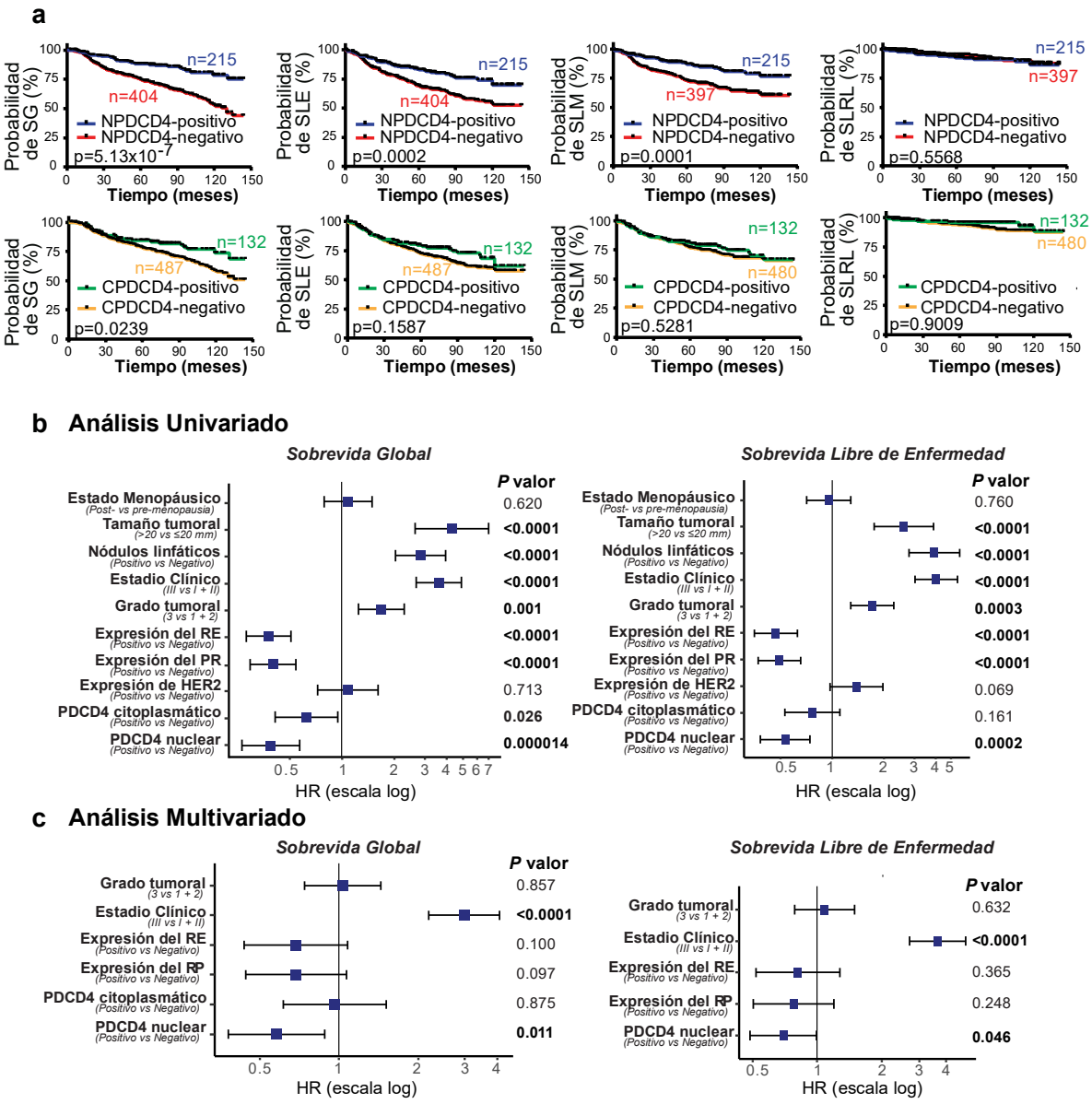


Figura 2. La expresión de PDCD4 nuclear está asociada con un pronóstico clínico más favorable en CM **(a)** Con el objeto de correlacionar la expresión de NPDCD4 o CPDCD4 con la sobrevida global (SG), la sobrevida libre de enfermedad (SLE), la sobrevida libre de metástasis a distancia (SLM) o la sobrevida libre de recaída local (SLRL) se realizó el análisis de sobrevida por Kaplan-Meier (KM) y el test log-rank. **(b y c)** Gráficos "forest plots" mostrando los *hazard ratios* (HR, cuadrados) y el intervalo de confianza de 95% (CI, líneas horizontales) del análisis de Cox univariado (b) y multivariado (c). Los P valores estadísticamente significativos se muestran en negrita.

La expresión de NPDCD4 es un biomarcador independiente de buen pronóstico clínico en CM de los subtipos Luminal A-like y Luminal B-like.

A continuación, investigamos el valor pronóstico de NPDCD4 en los distintos subtipos de CM. Los pacientes fueron clasificaron en los subtipos clínicos o sustitutos de CM, basados en determinaciones de IHC, según lo establecido por el consenso de St. Gallen (1) de la siguiente manera: subtipo receptor de hormonas (RH, RE y/o RP positivos) positivo y HER2 negativo (RH+/HER2-), subtipo RH positivo y HER2 positivo (RH+/HER2), subtipo RH negativo y HER2 positivo (RH-/HER2 +) y subtipo triple negativo (TN, RH-/HER2-).

Figura 3

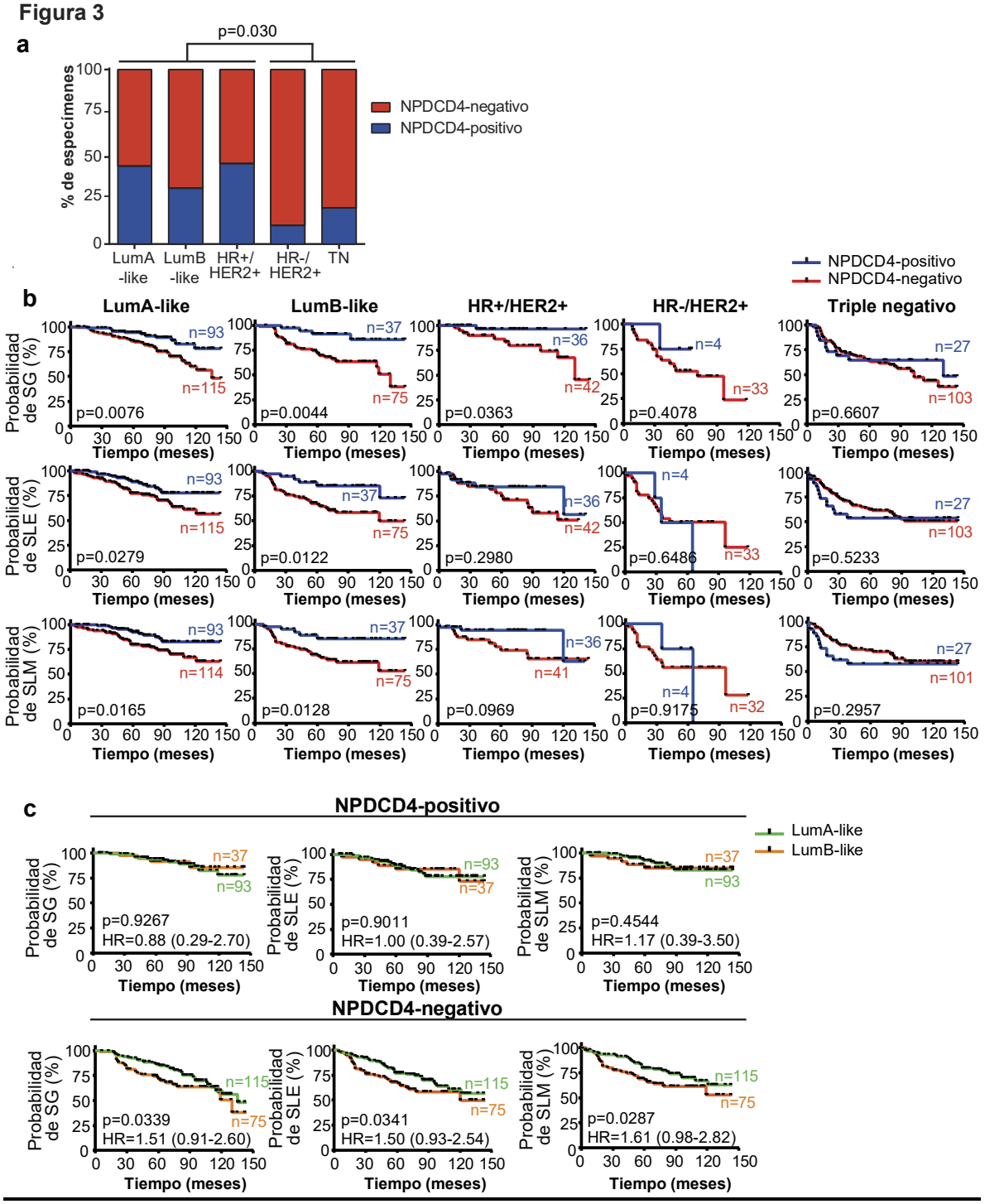


Figura 3. La expresión de NPDCD4 es un biomarcador independiente de buen pronóstico clínico en CM de los subtipos Luminal A-like y Luminal B-like. **(a)** Representación gráfica de los tumores con expresión de NPDCD4 positiva o negativa en subtipos de CM. Los pacientes fueron clasificados en los subtipos clínicos de CM según los criterios del Consenso de St. Gallen, y NPDCD4 fue detectada por IHQ como se detalló en Fig. 1. El número de casos positivos o negativos se muestra como porcentaje del total de casos analizados para cada subtipo. **(b)** Con el objeto de correlacionar la expresión de NPDCD4 con la sobrevida global (SG), la sobrevida libre de enfermedad (SLE), o la sobrevida libre de metástasis a distancia (SLM) en los distintos subtipos de CM, se realizó el análisis de sobrevida por Kaplan-Meier (KM) y el test log-rank. **(c)** Análisis de sobrevida de KM y test log-rank en tumores LumA-like y LumB-like que expresan NPDCD4 (NPDCD4-positivo) o no (NPDCD4-negativo).

Un total de 565 de 619 (91,3%) pacientes de nuestra cohorte presentaron datos histopatológicos y clínicos completos y se clasificaron en subtipos clínicos de CM. La incidencia de los subtipos RH+/HER2-, RH+/HER2+, RH-/HER2+ y TN en esta cohorte fue comparable a la observada en las cohortes caucásicas (14-16). Además, los pacientes con tumores del subtipo RH+/HER2- fueron clasificados dentro de los subtipos Luminal A-like (LumA-like) o Luminal B-like (LumB-like) según los criterios establecidos por el grupo de Perou. Siguiendo dichos criterios los tumores se definieron como LumA-like si eran RE-positivos y presentaban PR positivo ≥20%, o como LumB-like si eran RE-positivos con RP negativo o RP con baja expresión (<20%) (17). Como es bien conocido (14), los tumores del subtipo LumA-like mostraron mejores pronósticos que los tumores LumB-like. Los tumores LumA-like presentaron una sobrevida global a 5 años de 90.3% (IC 95%: 86.1-94.5) y una sobrevida libre de enfermedad a 5 años de 82.2% (IC de 95%: 76.7-87.6), mientras que los tumores LumB-like presentaron una sobrevida global y sobrevida libre de enfermedad a 5 años de 77.7% (IC 95%: 69.9-85.6) y de 73.3% (IC 95%: 64.9-81.7), respectivamente. Las SG y SLE de los pacientes con tumores LumA-like y LumB-like de nuestra cohorte fueron comparables a las observadas en otra cohorte previamente reportada (18). Encontramos una mayor prevalencia de positividad de NPDCD4 en tumores LumA-like (44.7%), LumB-like (33.0%) y RH+/HER2+ (46.2%) en comparación con los tumores RH-/HER2+ (10.8%) y TN (20.7%) (Fig. 3a). Curiosamente, la positividad de NPDCD4 fue significativamente menor en los tumores LumB-like que en los tumores LumA-like (33.0%, IC 95%: 24.3-41.8 vs 44.7%, IC 95%: 38.3-51.5, P = 0.0425). El análisis de las curvas de KM reveló que NPDCD4 se asoció con una SG más favorable en los pacientes con tumores del subtipo LumA-like, LumB-like y RH+/HER2+ (Fig. 3b). Nuestros resultados también revelaron que NPDCD4 se asoció con unas SLE y SLM más prolongadas en CM LumA-like y LumB-like, pero no en CM RH+/HER2+ (Fig. 3b). No se observó asociación significativa entre NPDCD4 y el resultado clínico en tumores RH-/HER2+ o TN (Fig. 3b). Curiosamente, los pacientes con CM del subtipo LumB-like con tumores NPDCD4 positivos presentaron tasas estimadas de SG, SLE y SLM similares a las observadas en pacientes con tumores del subtipo LumA-like que también expresan NPDCD4 (Fig. 3c), lo que indica que la presencia de NPDCD4 mejora el pronóstico clínico en CM LumB-like. Por el contrario, la pérdida de NPDCD4 resultó en SG, SLE y SLM más bajas en pacientes con tumores LumB-like en comparación con pacientes con tumores LumA-like (Fig. 3c).

Figura 4

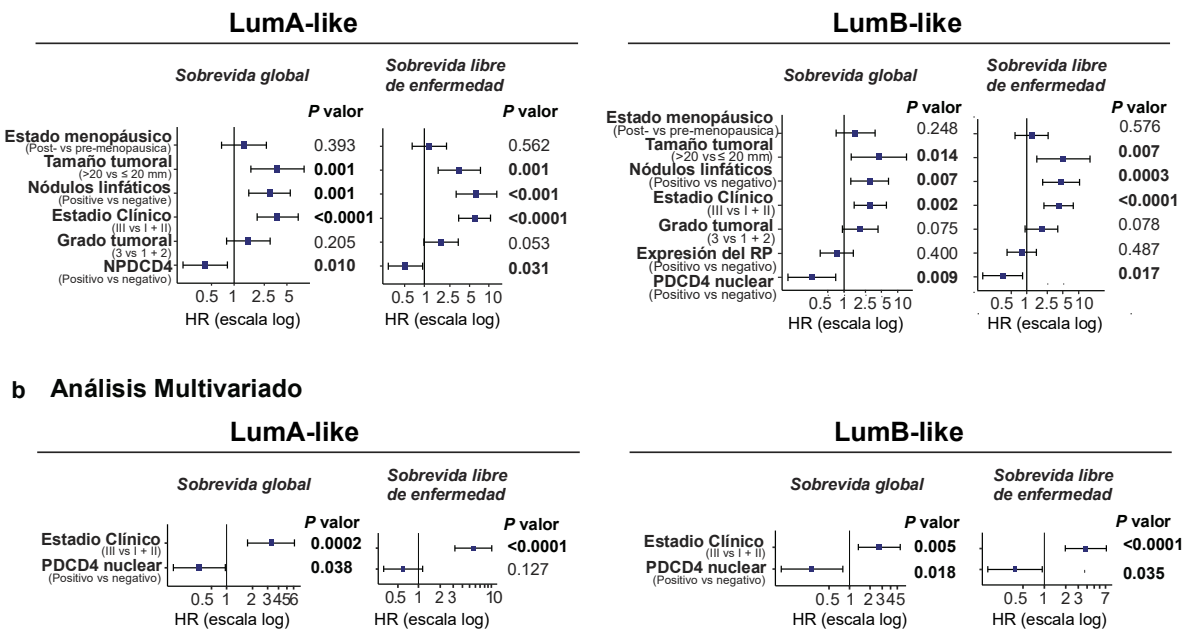


Fig. 4 Análisis de COX Uni- y Multivariado en pacientes con CM de los subtipos Luminal A-like y Luminal B-like. **(a y b)** Gráficos "forest plots" mostrando los *hazard ratios* (HR, cuadrados) y el intervalo de confianza de 95% (CI, líneas horizontales) del análisis de Cox univariado (a) y multivariado (b). Los P valores estadísticamente significativos se muestran en negrita.

El análisis de Cox univariado reveló que NPDCD4 estaba asociado con una sobrevida global y una sobrevida libre de enfermedad más prolongada en pacientes con CM LumA-like y LumB-like (Fig. 4a). El análisis multivariado ajustado por el estadio clínico identificó la positividad de NPDCD4 como un predictor significativo e independiente de sobrevida global más prolongada en CM LumA-like y de sobrevida global y sobrevida libre de enfermedad más prolongadas en CM del subtipo LumB-like (Fig. 4b).

Validación de los hallazgos utilizando datos de expresión de ARNm de PDCD4 de pacientes con CM de bases de datos disponibles *on line.*

Para validar nuestros hallazgos, aprovechamos la existencia de bases de datos de pacientes con CM disponibles públicamente. Primero, usamos la herramienta de análisis de sobrevida disponible públicamente *on line* llamada K-M plotter, que contiene los datos de expresión de ARNm provenientes de *microarrays* así como los datos clínicos de seguimiento de pacientes con CM (19). Usando dicha plataforma, encontramos que los niveles elevados de ARNm de PDCD4 están asociados con un pronóstico clínico favorable en pacientes con CM del subtipo Luminal A (n = 1933) y Luminal B (n = 1149) (Fig. 5a).

Además, como segunda cohorte de validación, utilizamos los datos de ARNm y de seguimiento clínico de pacientes con CM de la base de datos de METABRIC (*Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*).

Figura 5

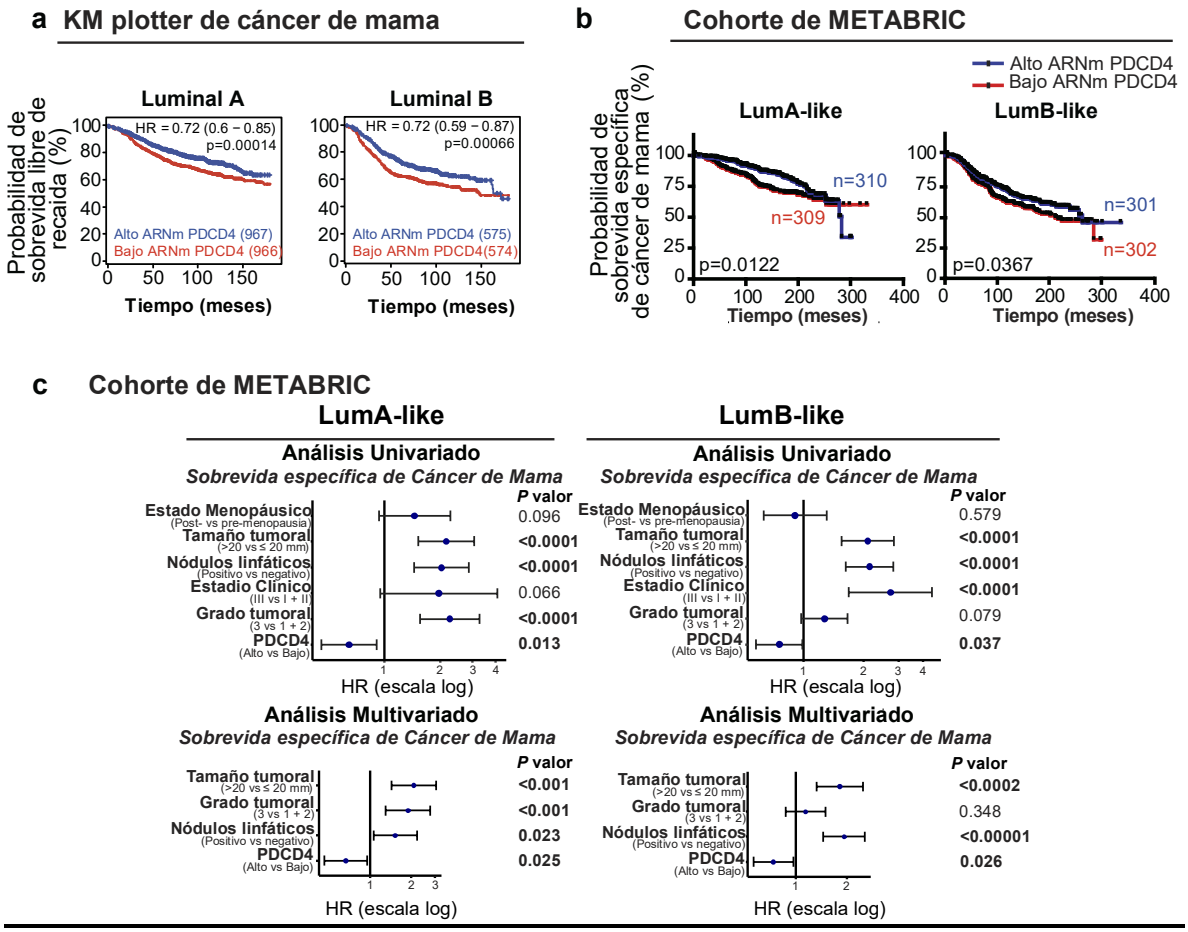


Figura 5. Análisis Bioinformático **(a)** Análisis utilizando KMplotter. Con el objeto de correlacionar los niveles de ARNm de PDCD4 con la sobrevida libre de recaída (*relapse-free survival*, RFS) de pacientes con tumores Luminal A o Luminal B se utilizó la herramienta KMplotter disponible *on line*. Los pacientes fueron estratificados en función de los niveles de ARNm para PDCD4 utilizando como valor de cutoff la mediana de los niveles de ARNm (Probe ID 202731_at). El análisis fue realizado en pacientes con tumores definidos como Luminal A o Luminal B según su subtipo molecular intrínseco. Las líneas rojas representan los tumores con baja expresión de ARNm de PDCD4, las líneas azules los tumores con alta expresión. **(b)** Análisis de sobrevida de KM y test log-rank en tumores LumA-like y LumB-like de la cohorte de METABRIC. Los pacientes fueron estratificados en función de los niveles de ARNm para PDCD4 utilizando como valor de cutoff la mediana de los niveles de ARNm. **(c)** Gráficos "forest plots" mostrando los *hazard ratios* (HR, cuadrados) y el intervalo de confianza de 95% (CI, líneas horizontales) del análisis de Cox univariado y multivariado correspondiente a la cohorte de METABRIC.

Nuestro análisis consideró las muestras de METABRIC clasificadas como RE+/HER2-, con perfiles de expresión génica de baja o alta proliferación (que representan a los subtipos de CM LumA-like y LumB-like, respectivamente) (20). El análisis KM reveló una asociación entre los niveles de ARNm de PDCD4 y un pronóstico más favorable en pacientes con CM del subtipo LumA-like y LumB-like (Fig. 5b). El análisis de Cox multivariado ajustado por el tamaño tumoral, por el status de los ganglios linfáticos y el grado tumoral, identificó la expresión de ARNm de PDCD4 como un predictor independiente de buen pronóstico en CM LumA-like y LumB-like de la cohorte METABRIC (Fig. 5c). En conjunto, estos hallazgos demuestran que la expresión de NPDCD4 es un biomarcador independiente de buen pronóstico en CM de los subtipos LumA-like y LumB-like.

DISCUSIÓN

La identificación de biomarcadores que predigan la recurrencia de la enfermedad en CM es crucial para seleccionar las terapias adyuvantes más adecuadas. Aquí se demuestra que la expresión de PDCD4 nuclear es un biomarcador independiente de buen pronóstico en los subtipos Luminal A-like y Luminal B-like. Particularmente importante es el hallazgo en el subtipo Luminal B-like, el cual tiene peor pronóstico y una reducida sensibilidad a las terapias endocrinas dirigidas a inhibir la acción del RE (revisado en Ref. 14).

Los niveles de PDCD4 tanto en el núcleo como en el citoplasma decrecen cuando el tejido normal de mama se maligniza (se vuelve más agresivo) y progresa a un carcinoma ductal invasivo (21). El estudio de esta cohorte de pacientes demostró que la expresión de PDCD4 nuclear es un predictor independiente de una SG más favorable en pacientes de CM del subtipo Luminal A-like, y de una SG y SLE más favorable en pacientes de CM del subtipo Luminal B-like. Consistente con el rol de PDCD4 como inhibidor de la metástasis (22), también se encontró la asociación entre la expresión de PDCD4 en el núcleo con una mayor sobrevida libre de recaída a distancia (SLM) en los subtipos mencionados. Pacientes con tumores Luminal B-like que expresan PDCD4 nuclear presentaron un pronóstico más favorable y comparable con los pacientes con tumores Luminal A-like que también expresan PDCD4 nuclear. En contraste, la pérdida de expresión de PDCD4 nuclear resultó en un incremento en el riesgo de la recurrencia y muerte de los pacientes del subtipo Luminal B-like respecto de los Luminal A-like. También se validaron los resultados mediante análisis *in silico* utilizando datos de expresión de ARNm de PDCD4 de cohortes más grandes.

Aunque la mayoría de las pacientes del subtipo Luminal-like responden a las terapias endocrinas, algunas (en su mayoría con tumores clasificados dentro del subtipo Luminal B-like) desarrollan recaídas fatales (14). Los tumores del subtipo Luminal A-like expresan altos niveles del RE y del RP, típicamente son de grado tumoral bajo, y presentan una baja fracción proliferativa (dada por la determinación de Ki67). En contraposición, los tumores del subtipo Luminal B-like expresan bajos o nulos niveles del RP, típicamente son de grado tumoral alto, y poseen una fracción proliferativa alta (1). Ensayos de paneles multigen (como la puntuación dada por la evaluación de 21 genes de recurrencia mediante el sistema Oncotype DX, o la evaluación del ensayo PAM50 de genes de riesgo (23)) son críticos para el refinamiento del pronóstico de las pacientes con tumores Luminal A- y B-like. A pesar de proveer una información valiosa, estos ensayos son costosos y por ende menos accesibles que los análisis histopatológicos de rutina. Los hallazgos encuadrados en este trabajo demuestran que la expresión de PDCD4 nuclear es

un factor predictor de buen pronóstico clínico en tumores clasificados como Luminal A- o B-like definidos en función de sus niveles de expresión del RP. Si bien sería interesante continuar validando estos hallazgos en estudios prospectivos basados en la determinación de NPDCD4 por IHQ en cohortes con un gran número de pacientes, en este trabajo los hallazgos fueron confirmados en cohortes de pacientes con tumores clasificados como Luminales A y Luminales B (cohorte perteneciente a la base de datos "Kaplan-Meier plotter"), y en tumores con perfiles de expresión génica de baja o alta proliferación (representando los subtipos Luminal A-like y Luminal B-like, respectivamente, de la cohorte METABRIC). En su conjunto, estos estudios demuestran que tanto la expresión proteica de NPDCD4 como los niveles de ARNm de PDCD4 están asociados a un resultado clínico favorable en pacientes con tumores Luminal A-like y Luminal B-like, independientemente del criterio que se use para definir a estos subtipos. La inclusión de la determinación de PDCD4 nuclear dentro de los paneles de IHQ usados rutinariamente en la clínica sería muy recomendable para predecir con mayor precisión el pronóstico de pacientes Luminal B-like. Además, esto permitiría guiar correctamente la elección de terapias; por ejemplo, decidir sobre la adición de quimioterapia o terapias dirigidas en aquellos pacientes portadores de tumores Luminal B-like PDCD4 nuclear negativos.

CONCLUSIONES

En este trabajo identificamos al PDCD4 nuclear como un factor independiente de buen pronóstico en pacientes con CM LumA- y LumB-like. Estos descubrimientos resaltan la importancia clínica de la evaluación de PDCD4 nuclear para predecir con precisión el pronóstico clínico en pacientes con tumores Luminal B-like y para guiar correctamente la adición de terapias citotóxicas en aquellos tumores propensos a exhibir resistencia a la terapia endocrina.

REFERENCIAS

1. Curigliano G, Burstein HJ, Winer P, Gnant M, Dubsky P, et al. 2017 De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. Ann Oncol 28:1700-1712.
2. Musgrove EA, Sutherland RL. (2009) Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. Nat Rev Cancer. 9(9):631-43.
3. Truong TH, Lange CA. (2018) Deciphering Steroid Receptor Crosstalk in Hormone-Driven Cancers. Endocrinology. 159(12):3897-907.
4. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med 2001; 344: 783–792.
5. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clin. Cancer Res 2007; 13:4429.
6. Lankat-Buttgereit B and Goke R. The tumour suppressor PDCD4: recent advances in the elucidation of function and regulation. Biol. Cell 2009; 101:309-317.

7. Santhanam AN, Baker AR, Hegamyer G, Kirschmann DA, Colburn NH. (2010) Pdcd4 repression of lysyl oxidase inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. Oncogene. 29(27):3921-32.

8. Qi L, Bart J, Tan LP, Platteel I, Sluis T, Huitema S, Harms G, Fu L, Hollema H, Berg A. (2009) Expression of miR21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. BMC Cancer. 9:163.

9. Venturutti L, Romero LV, Urtreger AJ, Chervo MF, Cordo Russo RI, Mercogliano MF, Inurrigarro G, Pereyra MG, Proietti CJ, Izzo F, Diaz Flaque MC, Sundblad V, Roa JC, Guzman P, ED BdKJ, Charreau EH, Schillaci R, Elizalde PV. (2016) Stat3 regulates ErbB-2 expression and co-opts ErbB-2 nuclear function to induce miR-21 expression, PDCD4 downregulation and breast cancer metastasis. Oncogene. 35(17):2208-22.

10. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL. (2002) Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. J Clin Oncol. 20(17):3628-36. (https://doi.org/10.1200/JCO.2002.02.026).

11. Page DL, Ellis IO, Elston CW. (1995) Histologic grading of breast cancer. Let's do it. Am J Clin Pathol. 103(2):123- 4.

12. Madera S, Chervo MF, Chiauzzi VA, Pereyra MG, Venturutti L, Izzo F, et al. Nuclear PDCD4 expression defines a subset of luminal B-like breast cancers with good prognosis. Horm Cancer. 2020;11:218–39.

13. Mudduluru G, Medved F, Grobholz R, Jost C, Gruber A, Leupold JH, Post S, Jansen A, Colburn NH, Allgayer H 2007 Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer. Cancer 110:1697-1707.

14. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K 2010 Metastatic behavior of breast cancer subtypes. J Clin Oncol 28:3271-3277.

15. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN 2009 The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. Oncologist 14:320-368.

16. Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K 2019 Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. Cancer Discov 9:176-198.

17. Prat A, Cheang MC, Martin M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, Tyldesley S, Gelmon K, Bernard PS, Nielsen TO, Perou CM 2013 Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. J Clin Oncol 31:203-209.

18. Hennigs A, Riedel F, Gondos A, Sinn P, Schirmacher P, Marme F, Jager D, Kauczor HU, Stieber A, Lindel K, Debus J, Golatta M, Schutz F, Sohn C, Heil J, Schneeweiss A 2016 Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study. BMC Cancer 16:734.

19. Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z 2010 An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. Breast Cancer Res Treat 123:725-731.

20. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Graf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S, Langerod A, Green A, Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowetz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Borresen-Dale AL, Brenton JD, Tavare S, Caldas C, Aparicio S 2012 The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. Nature 486:346-352.

21. Wen YH, Shi X, Chiriboga L, Matsahashi S, Yee H, Afonja O. (2007) Alterations in the expression of PDCD4 in ductal carcinoma of the breast. Oncol Rep. 18(6):1387-93.

22. Jansen AP, Camalier CE, Stark C, Colburn NH. (2004) Characterization of programmed cell death 4 in multiple human cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity. Mol Cancer Ther. 3(2):103-10.

23. Prat A, Ellis MJ, Perou CM. (2011) Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. NatRev Clin Oncol. 9(1):48-57.

ABSTRACT

BC is a complex disease, which presents different molecular or clinical subtypes. The hormone receptor-positive (estrogen and/or progesterone receptor (PR)-positive) and HER2-negative breast cancer (BC) subtype is a biologically heterogeneous entity that includes luminal A-like (LumA-like) and luminal B-like (LumB-like) subtypes. Decreased PR levels is a distinctive biological feature of LumB-like tumors. These tumors also show reduced sensitivity to endocrine therapies and poorer prognosis than LumA-like tumors. PDCD4 (programmed cell death 4) is a tumor suppressor protein highly involved in BC metastasis. We previously reported that the nuclear function of ErbB-2 as a transcription factor (TF) and also as a coactivator of the TF Stat3, leads to an increase in expression of microRNA-21 (miR-21), therefore decreasing PDCD4 expression and promoting metastasis in BC. With the aim of exploring the clinical relevance of PDCD4 in BC, we analyzed PDCD4 expression by immunohistochemistry (IHC) in a cohort of 619 patients with primary invasive BC. We identified PDCD4, located in the nucleus (NPDCD4), as an independent prognostic factor of good clinical outcome in LumA-like and LumB-like subtypes. NPDCD4-positive LumB-like tumors presented overall and disease-free survival rates comparable to those of NPDCD4-positive LumA-like tumors, indicating that NPDCD4 improves the outcome of LumB-like patients. In contrast, NPDCD4 loss increased the risk of disease recurrence and death in LumB-like compared with LumA-like tumors. This, along with our results showing that LumB-like tumors present lower NPDCD4 positivity than LumA-like tumors, suggests that NPDCD4 loss contributes to endocrine therapy resistance in LumB-like BCs. Correlation of PDCD4 mRNA expression and patient outcome using publicly available KM plotter database, showed similar results. Our discoveries highlight NPDCD4 as a novel biomarker in LumA- and LumB-like subtypes, which could be included in the panel of immunohistochemical markers used in the clinic to accurately predict the prognosis of LumB-like tumors.

ANEXO 1

Características clínico-patológicas de la cohorte latinoamericana de CM

Característica	Cohorte total	
	N pacientes	%
Número total	619	
Edad (años)		
Media	56.38	
Desvío estándar	12.94	
Rango	18-84	
Tiempo de seguimiento (meses)		
Mediana	73	
Rango	2.4-144	
Estado menopáusico		
Pre-menopáusico	210	33.93%
Post-menopáusico	409	66.07%
Tamaño tumoral		
T1	170	27.46%
T2	323	52.18%
T3	83	13.41%
T4	35	5.65%
No documentado	8	1.29%
Compromiso ganglionar		
N0	291	47.01%
N1	168	27.14%
N2	116	18.74%
N3	39	6.30%
No documentado	5	0.81%
Metástasis a distancia		
M0	619	100.00%
M1	0	0.00%
Estadio clínico		
I	123	19.87%
II	317	51.21%
III	178	28.76%
IV	0	0.00%
No documentado	1	0.16%
Grado tumoral		
1	97	15.67%
2	288	46.53%
3	212	34.25%
No documentado	22	3.55%
Receptor Estrógeno		
Positivo	423	68.34%
Negativo	188	30.37%
No documentado	8	1.29%
Receptor Progesterona		
Positivo	349	56.38%
Negativo	262	42.33%
No documentado	8	1.29%

Característica	Cohorte total	
	N pacientes	%
Receptor Progesterona (%)		
≥ 20%	272	43.94%
1-20%	77	12.44%
No documentado	8	1.29%
HER2		
Positivo	116	18.74%
Negativo	462	74.64%
No documentado	41	6.62%
Subtipo de CM		
Luminal A-like	208	33.60%
Luminal B-like	112	18.09%
HR+/HER2+	78	12.60%
HR-/HER2+	37	5.98%
TN	130	21.00%
No clasificado	54	8.72%
Cirugía		
Conservadora	313	50.57%
Mastectomía	301	48.63%
No documentado	5	0.81%
Terapia endocrina adyuvante		
Sí	413	66.72%
No	199	32.15%
No documentado	7	1.13%
Quimioterapia adyuvante		
Sí	458	73.99%
No	157	25.36%
No documentado	4	0.65%
Trastuzumab		
Sí	54	8.72%
No	565	91.28%
No documentado	0	0.00%
Radioterapia		
Sí	407	65.75%
No	89	14.38%
No documentado	123	19.87%
Eventos durante el seguimiento		
No	426	68.82%
Sí	193	31.18%
No documentado	0	0.00%
Descipción de eventos		
Recurrencia local y metástasis a distancia	15	2.42%
Sólo recurrencia local	28	4.52%
Sólo metástasis a distancia	143	23.10%
No documentado	7	1.13%

CONTROL INMUNOHEMATOLÓGICO DE EMBARAZADAS DE LA PROVINCIA DE SAN JUAN

Silvana A. Farina Álves [2], Antonio Archilla [1],
Elizabeth González [1,2], Alfredo J. Laplagne [1,2]

[1] Centro Integral de la Mujer y el Niño - CIMYN,
[2] Instituto Provincial de Hemoterapia - IPHEM

RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN

La enfermedad hemolítica perinatal (EHP) es una afección inmunológica aloinmune contra antígenos de origen paterno presentes en los hematíes fetales y del recién nacido. La EHP suele ser severa, en particular por el antígeno D. Los avances en la prevención de la inmunización por el antígeno D han disminuido la incidencia de esta enfermedad. La EHP por ABO, ha sido siempre más frecuente, pero su relación con muerte fetal o neonatal es menor que la de la EHP por anti D.

El presente proyecto se realizó en la provincia de San Juan durante el transcurso de 12 meses, fueron valoradas inmunohematológicamente embarazadas recepcionadas en los servicios del Instituto Provincial de Hemoterapia (IPHEM) y Centro Integral de la Mujer y el Niño (CIMYN).

El Objetivo general propuesto fue realizar estudios inmunohematológicos durante el primer trimestre de embarazo. Los Objetivos específicos propuestos para este trabajo fueron**:** Preparar los servicios de Maternidad y Banco de Sangre ante contingencias hemorrágicas en el momento del parto y controlar la embarazada sensibilizada. A toda embarazada se le realizó el control inmunohematológico, que comprende la determinación del grupo sanguíneo, fenotipo de *Rhesus* y la detección de Anticuerpos irregulares (AI). Durante el periodo comprendido de 16 de septiembre de 2019 al 31 de agosto de 2020 fueron estudiadas un total 209 embarazadas, se analizaron 156 embarazadas de CIMYN y 53 embarazadas en IPHEM. De las determinaciones de grupo sanguíneo (ABO) de las embarazadas de CIMYN, de las 156 embarazadas, resultaron 90 grupo O (58 %), 16 grupo B (10 %), 48 grupo A (31 %), y 2 pacientes grupo AB (1%). En IPHEM respecto al grupo sanguíneo (ABO) de las 53 embarazadas, resultaron 33 grupo O (62 %), 7 grupo B (13 %), 13 grupo A (25%), y ningún paciente grupo AB (0%).Siendo el Antígeno Rh D Positivo el más prevalente en ambos centros de estudio, con 165 pacientes y 44 pacientes Rh D Negativo.

En referencia al resto de los antígenos del sistema Rh estudiados, se hallaron en el total de las pacientes RhD Positivo 48 embarazadas R1r, 44 R1R2, 31 R1R1, 23 r2r, 15 R2R2, 2 RzR1y 2 Ror. En los pacientes Rh D Negativo, se hallaron 43 embarazadas rr y un caso r´r.

La detección de los Anticuerpos Irregulares en ambos centros de estudio, logró detectar la presencia de 5 pacientes con presencia de Anti D, de bajo título en todos los casos.

Conclusión: Resulta fundamental para el correcto diagnóstico, control, tratamiento y prevención de esta patología la integración de un equipo interdisciplinario formado por el obstetra, el neonatólogo y el especialista en Medicina Transfusional. A partir de ello, se puede procurar el apoyo de las autoridades de salud con el propósito de unificar criterios para el control y prevención, así como para generar medidas para que toda paciente embarazada pueda acceder al beneficio de la inmunoprofilaxis anti D.

Palabras clave: Enfermedad hemolítica perinatal, isoinmunización Rh, anticuerpos irregulares.

MARCO TEORICO

En solo 50 años la enfermedad hemolítica perinatal por isoinmunización anti D pasó de ser una enfermedad sin etiología conocida, incurable y no prevenible, a la situación actual en que por las técnicas de prevención, diagnóstico oportuno y tratamiento especializado tiene baja incidencia y altas expectativas de sobrevida, incluso en los casos más severos. Se describe la historia, las técnicas de prevención, diagnóstico, manejo y tratamiento de la enfermedad.

Todo parece indicar que fue descrita por primera vez en el año 1609 en Francia por el reporte de una matrona del nacimiento de un par de gemelos, el primero mortinato por lo que hoy interpretaríamos como hidrops, y el segundo severamente ictérico, que muere algún tiempo después por lo que hoy día conocemos como kernicterus. El año 1892, Ballantyne publica su obra *"The diseases and deformities of the foetus"*y describe las características del recién nacido hidrópico, pero no es hasta el año en 1932 en que Diamond (1) unifica en una sola entidad hidrops, icterus gravis neonatorum y anemia neonatal como diferentes fases de una misma enfermedad, todas ellas con la presencia de eritroblastos como punto en común (eritoblastosis fetalis). Avanzando hacia la explicación etiológica de la enfermedad, Darrow en 1938 (2) supone correctamente la presencia de un anticuerpo materno contra la sangre fetal, pero equivocadamente estima que el antígeno es la hemoglobina fetal. En 1940, Landsteiner y Wiener (3) describen la aglutinación de glóbulos rojos de humanos de origen caucásico puestos en contacto con suero de conejos inoculados con glóbulos rojos de monos Rhesus: al 85% que aglutinan les denominan *"Rh"* positivos. Un año después Levine (4) describe una reacción hemolítica en una madre que acaba de dar a luz a un hijo mortinato hidrópico y que ha recibido una transfusión con sangre de su marido aparentemente compatible. El propone correctamente que el feto posee un antígeno presente en el padre, pero ausente en la madre. Los grupos sanguíneos clásicos ya habían sido descritos en la década de 1930. Hasta la primera mitad del siglo XX, la única esperanza para las madres afectados de EHP por isoinmunización Rh era que ésta se manifestara lo más tardíamente posible, esperando que al momento del nacimiento el recién nacido no estuviera severamente enfermo. En 1946, Wallerstein (5) comunica su experiencia con el único tratamiento hasta entonces posible: la exanguíneo transfusión neonatal de glóbulos rojos, siendo demostrada por Allen en 1950 (6) como capaz de modificar la evolución del recién nacido en riesgo de desarrollar kernicterus. Una segunda conducta capaz de modificar el curso natural de la enfermedad es publicado por Allen en 1954 (7) y Chown en 1958 (8) es el nacimiento prematuro que disminuía el impacto de las graves complicaciones de la anemia e hiperbilirrubinemia, instaurándose entonces la interrupción prematura del embarazo como un arma terapéutica. En 1958, Cremer (9) publica su experiencia con la fototerapia, luego de tomar muy seriamente en cuenta las observaciones empíricas de la enfermera

Ward del hospital general de Rochford, Essex, en Inglaterra quien observó que los prematuros ictéricos que reciben luz solar directa *"destiñen"* más rápidamente que sus congéneres que no la reciben.

En ese tiempo se podía diagnosticar las madres RhD negativo, identificar aquellas sensibilizadas, sospechar el grado de enfermedad perinatal de acuerdo a los títulos de anticuerpos y los antecedentes previos, para luego ofrecer alguna de las modalidades terapéuticas que hemos mencionado. Nuevamente, la capacidad de observación determina un avance, al publicar Liley (10) en 1961, su experiencia en EHP correlacionando el grado de enfermedad con los niveles de bilirrubina a la espectrofotometría en líquido amniótico obtenido por amniocentesis, sugerido casi una década antes por Bevis en 1952 (11) al intentar contestar éste la relación existente entre la coloración marcadamente amarilla del líquido amniótico y la gravedad de la enfermedad. Dos años más tarde el mismo Liley (12) comunica su experiencia con transfusión intrauterina intraperitoneal en el manejo de los fetos severamente enfermos y que no podían ser tributarios de nacimiento prematuro como medida terapéutica. Casi simultáneamente, Freda (13) comunica sus resultados en la prevención de la enfermedad a través de la administración de gamablobulina anti D luego de la inoculación a sujetos RhD negativos convictos de la cárcel de Sing-Sing con glóbulos rojos RhD positivos, colocando así el último eslabón de esta cadena que hemos reseñado brevemente. A partir de entonces y tras solo medio siglo de esfuerzo, nos enfrentamos hoy a una enfermedad en que fueron dilucidadas su etiopatogenia, los elementos para su diagnóstico, su manejo, tratamiento y prevención.

Antes de la introducción de la terapia transfusional y de la ya en desuso hemoterapia para el tratamiento de la anemia, las mujeres se sensibilizaban solo durante el embarazo y parto. Una vez introducida la terapia transfusional pero antes del descubrimiento del sistema Rh, la mayor parte de las personas se sensibilizaron por esta vía, lo que hoy se evita con el sistemático estudio de compatibilidad antes de una transfusión sanguínea, siendo nuevamente en la actualidad los eventos del embarazo y parto las causas de la isoinmunización. En el año 1958, Kleihauer (19) demostró la existencia de la hemorragia feto materna (HFM) a través de la presencia de glóbulos rojos fetales en sangre materna por la técnica que hoy lleva su nombre y que se basa en la resistencia de la hemoglobina fetal a ser removida del glóbulo rojo sometido a una alta concentración ácida, diferenciándose así de los glóbulos rojos maternos luego de ser teñidos con eosina. Con esta técnica Bowman (20) demostró que en el 75% de las embarazadas hay evidencia de HFM en algún momento del embarazo y parto, la que habitualmente es de baja cuantía, pero en un 1% de los casos puede ser de hasta 5 ml y en el 0,25% alcanzar volúmenes tan altos como 30 ml. También hay diferencias en la incidencia y cuantía de la HFM en los diferentes trimestres del embarazo: 3% en el primer trimestre (0,03 ml); 12% en el segundo trimestre (generalmente menos de 0,1 ml) y hasta 46% en el tercer trimestre (ocasionalmente hasta 25 ml). Algunos eventos obstétricos aumentan el riesgo de HFM como son la hemorragia anteparto, operación cesárea, extracción manual de la placenta y versión externa. Dado que los antígenos del sistema Rh están presentes tan tempranamente como a los 30 días de gestación, la demostrada HFM que ocurre en el aborto espontáneo (generalmente menos de 0,1 ml) y la del aborto provocado en un 20 a 25% de los casos con volúmenes que exceden los 0,2 ml en el 4% de los casos, justifican las medidas de prevención de isoinmunización que se discutirán más adelante.

La respuesta inmune materna se efectúa en dos fases. La respuesta primaria inicial requiere de volúmenes relativamente altos, se instala en forma lenta usualmente en 6 a 12 semanas y hasta de 6 meses en aparecer. Es mediada por IgM por cuyo peso molecular

de 900.000 no atraviesa la barrera placentaria y la que es pronto seguida por IgG que si atraviesa la placenta (peso molecular de 160.000). Estos anticuerpos se fijan en el glóbulo rojo fetal y se inicia el proceso hemolítico. Una segunda HFM, aun cuando sea de bajo volumen es capaz de desencadenar en pocos días una respuesta inmune secundaria mediada especialmente por IgG que tras nuevos episodios de HFM, provoca importantes alzas en los títulos de aglutininas.

Como se ha dicho anteriormente, la isoinmunización es dependiente del volumen de sangre transfundida y se requieren de tan solo 0,3 ml de sangre RhD positivo en voluntarios RhD negativos para provocar la isoinmunización. Tras un volumen de 1 ml, se sensibiliza un 15%; un 33% tras volúmenes de 10 ml y 65% después de volúmenes de 50 a 250 ml (21). La respuesta secundaria se puede desencadenar con dosis tan bajas como 0,05 ml de glóbulos rojos RhD (+).

La incompatibilidad ABO entre la madre y el feto otorga protección a la isoinmunización anti D (23); cuando esta existe hay una reducción del riesgo de isoinmunización anti D al 1,5-2%. Se estima que esta protección es debida a que la rápida hemólisis de los glóbulos rojos fetales en la sangre materna causada por la incompatibilidad ABO no permite la instalación de la respuesta primaria anti D. Esta protección no existe para una respuesta inmune secundaria si la madre ya ha desarrollado una respuesta inmune anti D primaria.

El riesgo de isoinmunización detectable a los seis meses del parto de un recién nacido RhD positivo y ABO compatible es de 8 a 9%. Sin embargo, un número igual de mujeres se sensibiliza en forma indetectable en el primer embarazo, fenómeno que solo se evidencia en un próximo embarazo con feto RhD (+), cuando como consecuencia de una HFM aparece una respuesta inmune secundaria. Por lo antes expuesto, el riesgo total de isoinmunización debe considerarse aproximadamente de un 16% en madres que dan a luz un recién nacido RhD (+) y ABO compatible (23). El riesgo de isoinmunización es aproximadamente el mismo en un segundo embarazo con recién nacido RhD positivo y ABO compatible y puede alcanzar hasta un 50% al quinto embarazo de las mismas características. Es destacable que hasta un 30% de personas RhD negativas no desarrollan una respuesta inmune primaria, independientemente del volumen ni la frecuencia de las exposiciones de sangre RhD positiva a la que son sometidas.

Se estima que la sensibilización posaborto espontáneo entre las 6 y 8 semanas es mínima y entre las 10 y 12 semanas de un 1,1-4,3%. Luego de un aborto provocado se ha reportado un riesgo de isoinmunización del 4-25 -%. La madre que se sensibiliza luego de un aborto es una "buena respondedora" y en su próximo embarazo su feto está en riesgo de una enfermedad hemolítica severa.

La IgG atraviesa fácilmente la barrera placentaria hacia la circulación fetal y se fija en los sitios antigénicos del glóbulo rojo los que están presentes tan temprano como a las 6 semanas de gestación. Esta reacción que es posible detectar a través del Coombs directo, no fija complemento produciéndose hemólisis en forma extravascular principalmente en el bazo. La eritropoyesis fetal ocurre inicialmente a nivel del hígado y bazo, desplazándose a la médula después del sexto mes de gestación. Si ocurre anemia por pérdida o hemólisis, la eritropoyesis extramedular estimulada por un aumento de la secreción de eritropoyetina se mantiene e incluso puede hacerse muy intensa con la consiguiente hepatomegalia que se observa en esta enfermedad. Como el esfuerzo de compensación suele ser incompleto, aparecen glóbulos rojos inmaduros (eritroblastos), de allí que Diamond la denominara eritroblastosis fetalis.

La gravedad de la enfermedad depende de la cuantía de IgG materna (expresada en el título), la afinidad de ésta por el antígeno presente en el glóbulo rojo fetal y la habilidad del feto para compensar la anemia sin desarrollar hidrops.

El control inmunohematológico comprende la determinación del grupo sanguíneo, fenotipo de Rhesus y la detección de Anticuerpos irregulares (AI).

- La inmensa mayoría de los antígenos de grupo sanguíneo pueden ser el origen de una incompatibilidad feto-materna (IFM), responsable de la enfermedad hemolítica del recién nacido. Pero los anticuerpos desarrollados por la madre más frecuentemente encontrados son los dirigidos contra los antígenos de los sistemas Rhesus y Kell.
- En todos los casos, ante una hallazgo positivo, se deben identificar y dosar los aloanticuerpos. La realización del fenotipo en el sistema implicado es pues indispensable para definir el carácter auto o alo del anticuerpo.
- Los autoanticuerpos no están implicados en IFM.
- El control mensual del título de anticuerpos se debe realizar cada mes hasta el término del embarazo. En caso de aumento del título de anticuerpos, se aumentará el control biopatológico y ecográfico.
- Importancia de las determinaciones de Grupo sanguíneo y factor Rh del padre. En efecto, si éste no posee el antígeno (al igual que la madre), el riesgo de IFM es nulo. Sin embargo, estas mujeres deben ser controladas por-que se debe sospechar siempre una pareja Rhesus positiva (incertidumbre posible en cuanto a la identidad del padre).
- La prevención de aloinmunización versus Rh1 se hace con una inyección de antiglobulinas anti-D en las 72 horas que siguen al parto o cuando hay un riesgo de paso de hematíes fetales (aborto, hemorragias, IVG...) en madre Rhesus negativo.

Protocolo en gestantes sensibilizadas (AI positivo).

Toda gestante Rh (D) negativo o positivo, sensibilizada por un anticuerpo, requiere una valoración y un seguimiento especial, tanto desde el punto de vista inmunohematológico como obstétrico.

En este punto puede ser necesaria la realización, simultánea o progresiva, de diferentes estudios complementarios que ayudarán a predecir la magnitud potencial del problema generado por la incompatibilidad materno-fetal:

- Identificación del Ac encontrado (materno).
- Titulación y/o cuantificación del anticuerpo materno.

Los Acs de clase IgM no requieren un seguimiento especial y, por tanto, no están indicados los estudios complementarios. La gestante puede continuar con el protocolo que le corresponda de acuerdo con su grupo Rh (D).

Los Anticuerpos de clase IgG y, muy especialmente los de especificidad anti-Rh (D), van a exigir estudios complementarios para poder precisar, en la medida de lo posible, qué gestantes y/o qué fetos van a ser subsidiarios de estudios o exploraciones más complejas incluyendo las de carácter invasivo.

La Titulación del anticuerpo continúa siendo la técnica más sencilla para valorar la evolución del Ac materno. Para que el título tenga valor debe ser realizado bajo las mismas condiciones técnicas, por el mismo personal siempre que sea factible y examinando en paralelo la muestra actual con la precedente.

Se entiende por Título crítico, aquél que una vez alcanzado puede asociarse a riesgo fetal y que, por ello, puede justificar exploraciones de carácter invasivo (cordocentesis) que nos permitan valorar más objetivamente el grado de anemización fetal.

El título crítico ha ido cambiando con el tiempo y, en la actualidad, se considera que muy raramente habrá riesgo fetal mientras el título se mantiene por debajo de 1: 128.

Hay que tener una especial consideración por los aumentos de título entre 2 determinaciones sucesivas, de manera que un incremento de título en dos diluciones puede ser una alarma indicativa de progresión de la inmunización materna y de previsible riesgo en el feto.

MANEJO DE LA EMBARAZADA RhD NEGATIVO

Para un adecuado manejo de la embarazada y su feto no solo es necesario conocer las diferentes etapas de la EHP sino que además se requiere que el especialista determine hasta que nivel de complejidad avanzará de acuerdo disponibilidad de las siguientes condiciones: laboratorio clínico capaz de efectuar test de coombs indirecto y su titulación; laboratorio clínico capacitado en realizar espectrofotometría en líquido amniótico; capacidad de efectuar amniocentesis guiada por ultrasonido; capacidad de estudio de velocimetría doppler de arteria cerebral media; capacidad de efectuar cordocentesis y TIU; capacidad del banco de sangre para preparar sangre para la TIU; unidad de neonatología capacitada para fototerapia, exsanguíneo-transfusión y atención de prematuros.

Toda embarazada, independiente de si es RhD negativo o positivo, debe ser evaluada en el primer control prenatal con un PAI. Si este es positivo y la paciente es RhD positivo, debe solicitarse de inmediato la determinación de anticuerpos irregulares. El manejo de esta condición depende del anticuerpo presente. Las embarazadas RhD negativo, podrán de acuerdo a la Prueba Coombs indirecta ser inmediatamente diferenciadas en aquellas que inician su embarazo no sensibilizadas de aquellas que lo hacen sensibilizadas.

De una manera práctica, las embarazas RhD negativo (-) pueden clasificarse en:

- No sensibilizadas.
- Sensibilizadas intraembarazo.
- Sensibilizadas preembarazo con o sin historia de EHP previa.

Embarazada RhD negativo no sensibilizada: Es imperativa la determinación de la condición RhD del progenitor, ya que si éste es RhD (-), no hay riesgo de incompatibilidad sanguínea al antígeno D y el embarazo podrá controlarse en forma habitual. Si el progenitor es RhD (+) o se desconoce su status RhD, el objetivo del control prenatal puede dividirse en:

- ✓ Identificación de las embarazadas que se sensibilizan intraembarazo (2%).
- ✓ Medidas en el embarazo y parto que disminuyan el riesgo de sensibilización.
- ✓ Profilaxis intraembarazo con gama globulina anti D a las no sensibilizadas.
- ✓ Profilaxis posparto a las embarazadas en riesgo de sensibilización (1,5-16%).

Identificación de las embarazadas que se sensibilizan intraembarazo: Como se ha señalado anteriormente, aproximadamente un 2% de las embarazadas con feto RhD (+), desarrollarán una respuesta inmune durante el embarazo, la que ocurre habitualmente después de las 28 semanas de gestación. La manera de identificar a este grupo de pacientes, es efectuar PAI en forma periódica. La secuencia recomendada es efectuar el segundo examen alrededor de las 22-24 semanas y repetirlo cada 4 semanas hasta el término del embarazo. En el momento en que el Coombs se hace positivo, el status de la paciente ha cambiado pasando a la categoría de "sensibilizada intraembarazo" y deberá seguir el manejo especializado. Si PAI permanece negativo, no hay indicación de interrupción del embarazo por el solo hecho de que la madre sea RhD (-).

Medidas en el embarazo y parto que disminuyan el riesgo de sensibilización*:* Especial cuidado deberá tomarse ante la necesidad de efectuar amniocentesis, versión externa u otros procedimientos que pueden provocar hemorragia feto-materna (ej.: biopsia de vellosidades coriónicas). En la atención del parto de las embarazadas RhD (-) no sensibilizadas debe omitirse el estrujamiento del cordón umbilical luego de la sección de éste y toda maniobra innecesaria para acelerar el desprendimiento placentario ya que igualmente incrementan el riesgo de ocurrencia y la cuantía de la hemorragia feto-materna.

Profilaxis intraembarazo y posparto con gama globulina anti-D: Existe actualmente clara indicación de administrar profilaxis anti D frente a situaciones que provocan o aumentan el riesgo de hemorragia transplacentaria. La dosis actualmente recomendada es de 250-300 ug de inmunoglobulina anti D, (IgG anti D), dosis que neutraliza 30 ml de sangre fetal. Deberá ajustarse la dosis si se comprueba hemorragia transplacentaria de mayor cuantía.

Está demostrado que la única medida para controlar el riesgo de sensibilización intraembarazo es la profilaxis universal con 250-300 ug de IgG anti D a las 26-28 semanas (25). Debe considerarse que por cada 100 veces que se administra se evitan un máximo de dos casos de sensibilización. No hay evidencia científica suficiente para repetir la dosis de IgG anti D si han transcurrido más de 12 semanas desde la profilaxis y no ha ocurrido el parto.

La administración de IgG anti D generalmente no produce positivización del Coombs indirecto y si lo hace, los títulos son habitualmente menores o iguales a 1:4. La recomendación actual es no repetir títulos una vez administrada la IgG anti D. Una vez ocurrido el parto, si el recién nacido es RhD (+) y el CD es negativo debe procederse a la profilaxis posparto.

Una vez ocurrido el parto se debe efectuar Grupo, Rh y CD en sangre de cordón. Si el recién nacido es RhD (-), la madre no requiere profilaxis. Si el recién nacido es RhD (+), y el CD es negativo, la madre debe recibir 250-300 ug de IgG anti D como profilaxis. Aunque hay diferencia en el riesgo de sensibilización, si hay compatibilidad o incompatibilidad ABO feto-materna, siempre deberá administrarse la profilaxis independientemente de esta condición. Si el CD es positivo, ha ocurrido sensibilización intraembarazo y la profilaxis materna no tendrá ningún efecto protector frente a un próximo embarazo por lo que ésta no debe administrarse.

SENSIBILIZACIÓN A OTROS ANTICUERPOS IRREGULARES

Como consecuencia de la disminución en la incidencia de la enfermedad hemolítica por isoinmunización anti D, ha cobrado relevancia aquella secundaria a anticuerpos contra otros antígenos del glóbulo rojo fetal, los que pueden ser del sistema Rh, diferentes de D, u otros. El clínico debe estar preparado a identificar estos anticuerpos toda vez que aparezca en una embarazada una prueba de PAI positiva y que el anticuerpo no sea anti D, para lo cual es imprescindible realizar la detección y el título del Anticuerpo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Realizar estudios, inmunohematológicos durante el primer trimestre de embarazo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar los servicios de Maternidad y Banco de Sangre ante contingencias hemorrágicas en el momento del parto.
- Controlar la embarazada sensibilizada

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto se realizó en la provincia de San Juan durante el transcurso de 12 meses embarazadas recepcionadas en los servicios del Instituto Provincial de Hemoterapia (IPHEM) y Centro Integral de la Mujer y el Niño (CIMYN), que fueron valoradas inmunohematológicamente durante su primer trimestre de embarazo. Las embarazadas previa aceptación del consentimiento informado se les tomó la muestra biológica correspondiente (extracción de una pequeña cantidad de su sangre, 5 ml aproximadamente) mediante la punción de una vena, la cual se colocó en tubos con una solución anticoagulante por una parte y en tubos sin dicha solución por otra, para obtener sangre total y suero respectivamente. A fin de realizar los análisis.

A toda embarazada se le realizó el control inmunohematológico, que comprende la determinación del grupo sanguíneo, fenotipo de *Rhesus* y la detección de Anticuerpos irregulares (AI).

a. Grupo Sanguíneo.

- Grupo Sanguíneo ABO, prueba Directa técnica microplaca.
- Prueba Inversa mediante técnica microplaca.
- Factor Rh D, mediante técnica microplaca
- Fenotipo Rh, mediante técnica de Microalgutinación en gel.
- Genotipo probable de Wiener.

b. Determinación de Anticuerpos Irregulares.

- Técnica de tarjeta gel coombs.

c. En gestantes sensibilizadas (AI positivo).

- Identificación del Ac encontrado (materno).
- Titulación y/o cuantificación del anticuerpo materno.

a. Determinación Grupo ABO, por prueba directa e inversa y Factor Rh D:

Técnica Microplaca:

- Muestra: Muestra de sangre anticoagulada con EDTA. Centrifugada a 3500 RPM por 10 minutos.
- Soporte de reacción: Microplacas de fondo U (8 filas x 12 columnas).
- Reactivos:
  - Antisueros anti-A, anti-B y anti-AB monoclonales IgM.
  - Antisuero anti-D monoclonal IgM.
  - Control Rh.
  - Solución de Baja fuerza iónica (LISS).
  - Hematíes reactivos, A1 y B, suspendidos al 2-5 % para la realización del grupo ABO (sérico).
- Instrumentos:
  - Equipo automatizado Diana Processor de Grifols
  - Centrífuga para Microplacas.
  - Agitador para Microplacas.
  - Visor con luz.

Técnica:

- Para la determinación en Microplaca se dispensaron 20 ul de los reactivos anti-A, anti-B y anti-AB, anti-D y Control Rh mediante Micropipeta automática. Posteriormente, las muestras se procesaron en el equipo Diana Processor, Una vez finalizada el proceso del sistema automatizado, se realizó la centrifugación a 400 g durante 30 segundos en la centrífuga de Microplaca.
- Luego, se colocó la microplaca en el agitador por 1 minuto. Se procedió a la lectura del mismo mediante visor con Luz.

Interpretación:

- Resultado Positivo Aglutinación
- Resultado Negativo: resuspensión de los hematíes.

Fenotipo Rh:

Microtécnica de aglutinación en gel.

Muestra: suspensión de glóbulos rojos al 5% en WDG Gel Sol (50uL de sedimento o concentrado de hematíes en 1 mL de DG Gel Sol.

Reactivos: Anti D, Anti C, Anti E, Anti e y Anti c. (Anticuerpos IgM)

Instrumentos:

- Tarjeta DG Gel, la cual contiene los siguientes microtubos:
  - Microtubo D (anti D monoclonal)
  - Microtubo C (anti C monoclonal)
  - Microtubo E (anti E monoclonal)
  - Microtubo c (anti c monoclonal)
  - Microtubo e (anti e monoclonal)
- Instrumentos:
- Centrifuga para tarjetas Gel.



Técnica:

Se procedió a añadir en cada uno de los microtubos indicados 10uL de la suspensión de hematíes al 5% previamente preparada. Se llevó a cabo la centrifugación de las tarjetas y por último se observó presencia o ausencia de aglutinación.

Interpretación:

Resultado Positivo: presencia de aglutinación a lo largo de la columna de gel.

Resultado Negativo: ausencia de aglutinación, observándose los hematíes en el fondo de la columna.

b. Técnica en tarjetas en gel para la determinación de Anticuerpos Irregulares:

La investigación de Anticuerpos Irregulares tiene como objetivo detectar los anticuerpos clínicamente significativos presentes en la muestra de la paciente, mediante la técnica de Antiglobulina Indirecta. Se realiza a través del uso de tarjetas en gel con hematíes reactivo de grupo O al 0,8 % (Panel I y II), que presentan los determinantes antigénicos más significativos de la mayoría de los sistemas de grupos sanguíneos.

Cada microtubo de la tajeta DG Gel Coombs contiene dextranos polimerizados en medio tamponado con conservantes y mezclados con Antiglobulna Humana polivalente (Mezcla de anticuerpos anti IgG policlonal de conejo y anti C3d monoclonal)

Muestra: Plasma. obtenido a partir de sangre total con anticoagulante (EDTA)

Reactivos:

– Panel celular I y II

– Tarjetas DG Gel Coombs

Instrumentos:

– Tarjeta de microtubos.

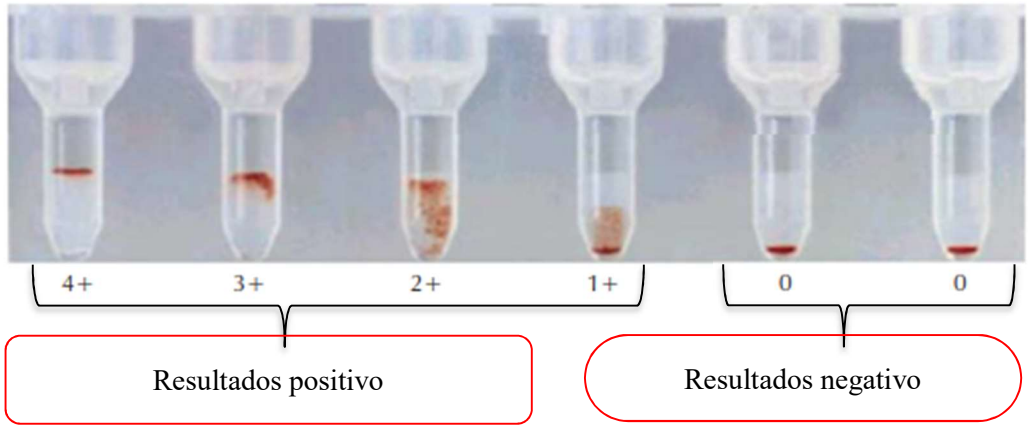
– Incubador de tarjetas.

– Centrífuga de tarjetas Gel.

La técnica realizada consistió en dispensar 25 ul de plasma de la embarazada a estudiar en el microtubo de la tarjeta. Luego se incorporó 50 ul de glóbulos de los paneles celulares I y II y se incubó la tarjeta 15 minutos a 37 ° C en el incubador de tarjetas. Por último, se centrifugó en la centrífuga de tarjetas durante 9 minutos. Posteriormente se observó la presencia o ausencia de aglutinación.

Interpretación:

La misma se basa en una lectura macroscópica que permite distinguir todo el rango de aglutinaciones: desde los resultados negativos O (-) hasta toda la variedad de resultados positivos que se expresan en forma de cruces según su intensidad en: 1+,2+,3+,4+.



c. Pruebas a realizar en las gestantes sensibilizadas (Anticuerpos Irregulares presentes):

Especificidad del Anticuerpo Irregular (identificación).

La Identificación de Anticuerpos Irregulares se lleva a cabo mediante la utilización de paneles de 11 células de grupo O, en suspensión al 3 %. Cada célula**,** está formada por hematíes procedentes de donantes específicos con fenotipos conocidos seleccionada para la identificación individual de los anticuerpos irregulares clínicamente significativos, así como la mayoría de combinaciones más frecuentes de anticuerpos.

- Muestra: Plasma. obtenido a partir de sangre total con anticoagulante (EDTA).
- Reactivos: Panel de 11 células con diferentes especificidades antigénicas conocidas.

Instrumentos:

- Tarjeta de microtubos.
- Incubador de tarjetas.
- Centrífuga de tarjetas Gel.

Técnica:

Se rotularon 11 pocillos de la tarjeta gel para cada paciente. Se adicionaron 25 ul de plasma en cada pocillo, luego se agregó 50 ul de los glóbulos correspondientes según el orden establecido del Panel de 11 células. Se incubó la tarjeta 15 minutos a 37 ° C en el incubador de tarjetas. Por último, se centrifugó en la centrífuga de tarjetas durante 9 minutos. Finalmente, se observó la presencia o ausencia de aglutinación en cada pocillo. Se comparó los resultados obtenidos con la cartilla de interpretación, correspondiente al proveedor del reactivo, para identificar el Anticuerpo en estudio.

Titulación del Anticuerpo:

El título de anticuerpo se determina utilizando una serie de diluciones dobles del suero frente a muestras de hematíes seleccionados los resultados son la expresión reciproca de la dilución máxima del suero, el titulo da una idea aproximada de la cantidad relativa de anticuerpo presente en el suero, o de la intensidad de la expresión del antígeno en los hematíes.

- Muestra: Plasma. obtenido a partir de sangre total con anticoagulante (EDTA)
- Solución salina fisiológica.

Técnica:

Se rotularon 10 tubos con numeración del 2 hasta 1024 y un tubo final sin diluir.

Se adicionaron 100 ul de solución fisiológica a cada tubo numerado, excepto último tubo sin diluir.

Se adicionó al primer tubo 2, 100 ul de plasma. Luego de mezclar por 3 veces, se transfirieron 100 ul de la dilución 2 al siguiente tubo, repitiendo el procedimiento hasta transferir la última dilución en el tubo sin diluir (tubo seco). Se obtuvieron así las diluciones seriadas de 1/2 hasta 1/1024. Se reservó el último tubo sin diluir en caso de continuar diluciones.

Se marcó una tarjeta DG Gel Coombs, colocando la identificación de la paciente y numerando cada pocillo con el total de diluciones realizadas.

Se añadieron 25 ul de muestra diluida a cada pocillo correspondiente. Posteriormente, se adicionaron 50 ul de suspensión de Hematíes Panel I y/o II al 0,8 %.

Se procedió a incubar por 15 minutos a 37 °C en Incubador para tarjetas. Luego, se centrifugó durante 9 minutos. Se procedió a la lectura de los resultados, siendo el título la inversa de la dilución del último tubo en la que se observó aglutinación.

RESULTADOS

Durante el periodo comprendido de 16 de septiembre de 2019 al 31 de agosto de 2020 fueron estudiadas un total 209 embarazadas, se analizaron 156 embarazadas de CIMYN y 53 embarazadas en IPHEM.

En función del estudio Inmunohematológico realizado a las pacientes, la tabla I y el gráfico Nº 1 muestran la frecuencia de determinaciones de grupo sanguíneo (ABO) de las embarazadas de CIMYN. De las 156 embarazadas, resultaron 90 grupo O (58 %), 16 grupo B (10 %), 48 grupo A (31 %), y 2 pacientes grupo AB (1%).

CIMYN	
GRUPO	**PORCENTAJE (%)**
O	58
B	10
A	31
AB	1

Tabla I: Porcentaje de Grupos Sanguíneos ABO.

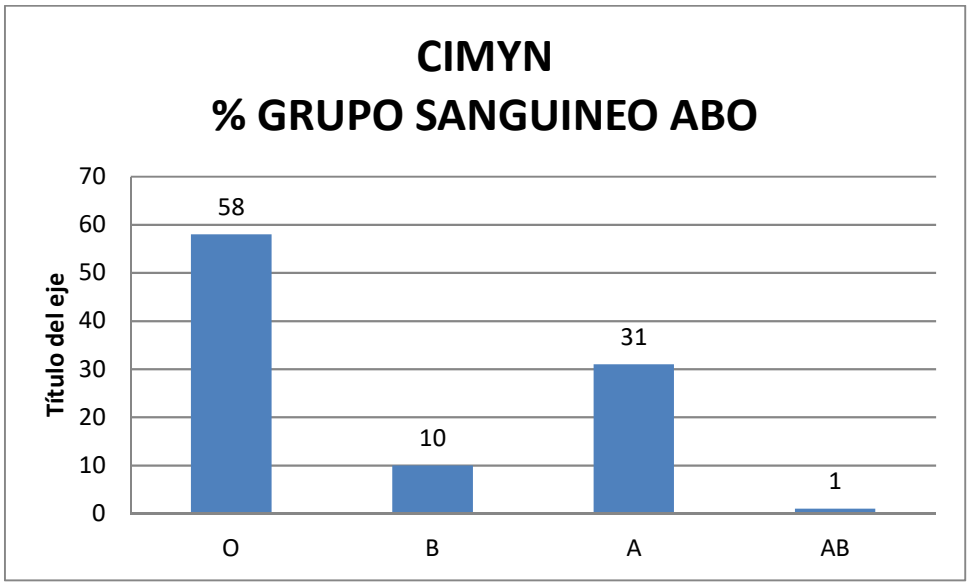


Gráfico Nº1: Porcentaje de Grupos Sanguíneos ABO.

La tabla II y el gráfico Nº 2 describen la frecuencia de determinaciones de grupo sanguíneo (ABO) de las embarazadas de IPHEM. De las 53 embarazadas, resultaron 33 grupo O (62 %), 7 grupo B (13 %), 13 grupo A (25%), y ningún paciente grupo AB (0%).

IPHEM	
GRUPO	**PORCENTAJE**
O	62
B	13
A	25
AB	0

Tabla II: Porcentaje de Grupos Sanguíneos ABO.

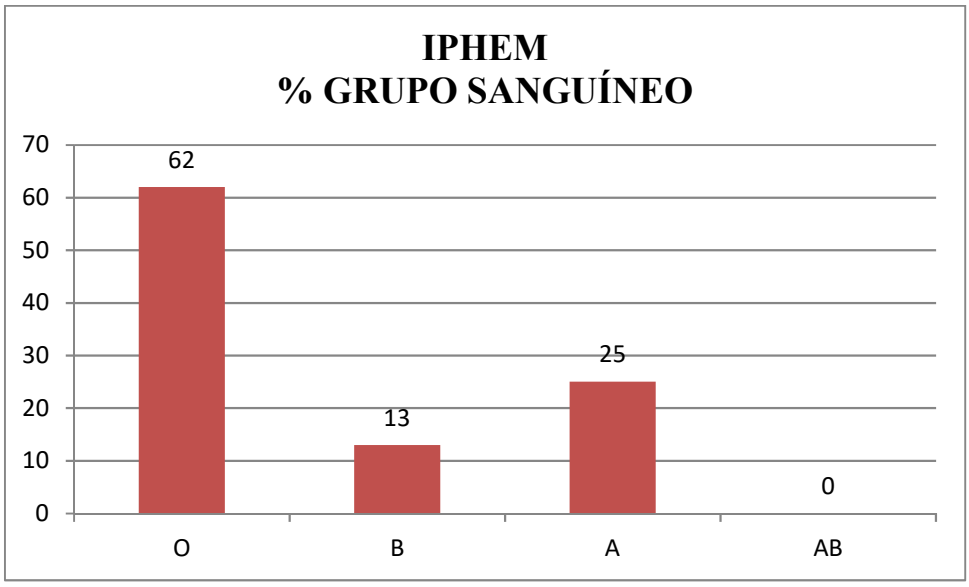


Gráfico Nº2: Porcentaje de Grupos Sanguíneos ABO.

La distribución obtenida en función del Factor Rh D, para cada centro de estudio, fue la siguiente:

De 156 embarazadas estudiadas en CIMYN, resultaron 126 Rh D positivo (81%) y 30 embarazadas Rh D negativo (19%). Ver Tabla III y Gráfico Nº3.

CIMYN	
Rh	**PORCENTAJE**
POSITIVO	81
NEGATIVO	19

Tabla III: Porcentaje Rh D.

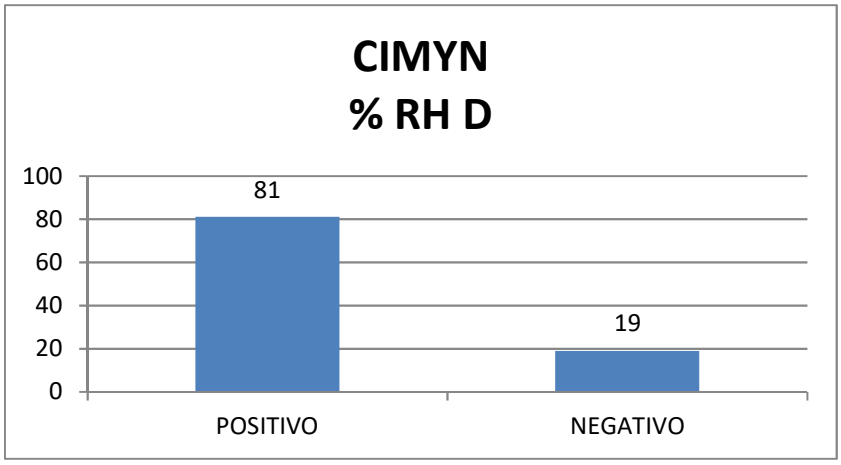


Gráfico Nº3: Porcentaje Rh D.

De 53 embarazadas pacientes estudiadas en IPHEM, resultaron 40 Rh D positivo (75%) y 13 embarazadas Rh D negativo (25%). Ver tabla IV y Gráfico Nº4.

IPHEM	
Rh	**PORCENTAJE**
POSITIVO	75
NEGATIVO	25

Tabla IV: Porcentaje Rh D.

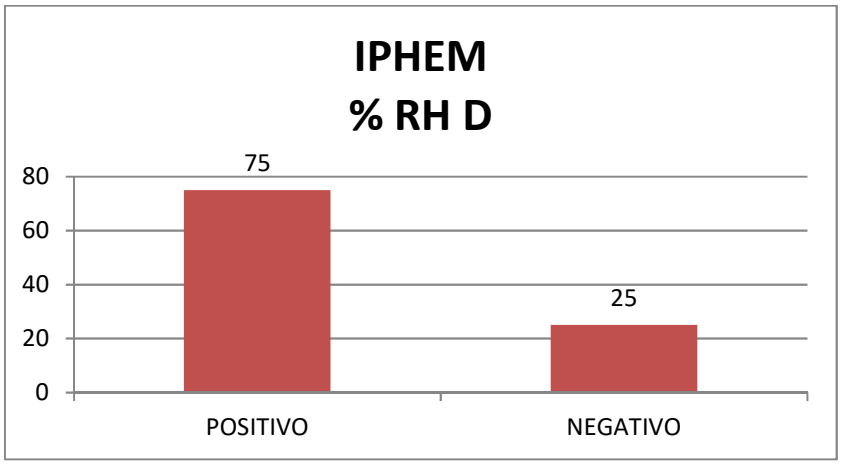


Gráfico Nº4: Porcentaje Rh D.

En función del fenotipo obtenido en el total de las pacientes analizadas, se expresó el genotipo Rh más probable según nomenclatura de Wiener.

En las pacientes Rh positivo, de CIMYN, en orden de frecuencia se obtuvo el siguiente genotipo más probable: R1R2 (37), R1r (35), R1R1 (20), R2r (19), R2R2 (13), RzR1 (1).

En las pacientes Rh negativo, de CIMYN, fueron rr (30) y r''r (1). Los datos obtenidos, para embarazadas de CIMYN, se presentan en la Tabla N.º V y Gráfico Nº5.

Las pacientes Rh positivo, de IPHEM, presentaron el siguiente genotipo más probable:

R1r (13), R1R1 (11), R1R2 (7), R2r (4), R2R2 (2), Ror (2).

Las pacientes Rh negativo, de IPHEM, fueron rr (13).

Los datos obtenidos, para embarazadas de IPHEM, se presentan en la Tabla VI y Gráfico Nº6.

CIMYN	
GENOTIPO WIENER	**PACIENTES**
Rh D POSITIVO	
R1R2	37
R1r	35
R1R1	20
R2r	19
R2R2	13
RzR1	1
Rh D NEGATIVO	
rr	30
r''r	1

Tabla V: Genotipo Rh.

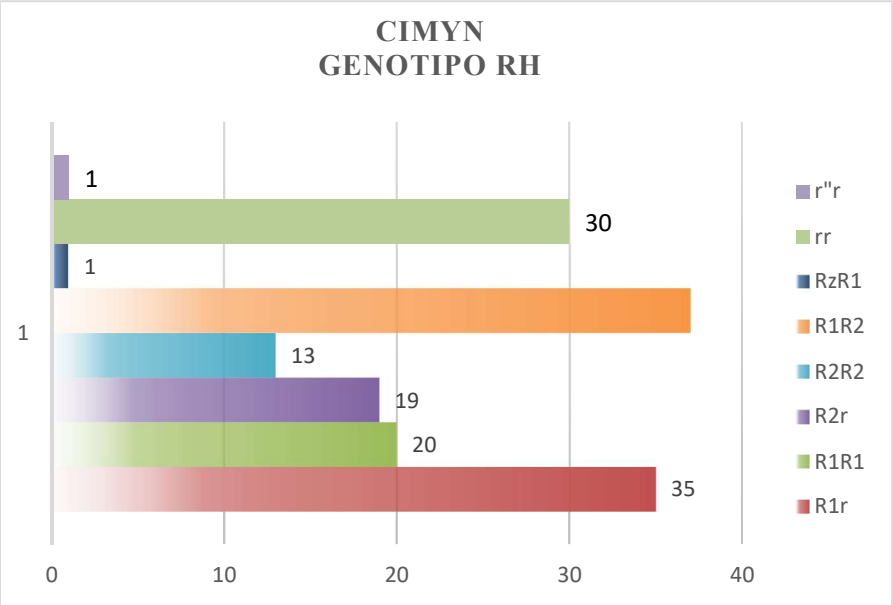


Gráfico Nº5: Genotipo Rh.

IPHEM	
GENOTIPO WIENER	**Pacientes**
Rh D POSITIVO	
R1r	13
R1R1	11
R2r	4
R2R2	2
R1R2	7
Ror	2
RzR1	1
Rh D NEGATIVO	
rr	13

Tabla VI: Genotipo Rh.

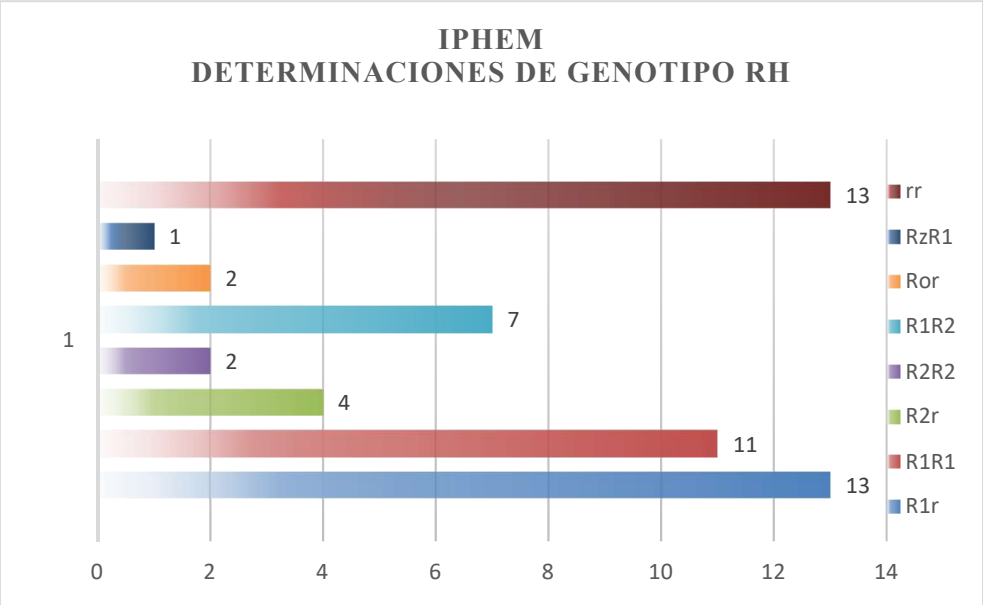


Gráfico Nº6: Genotipo Rh.

El tamizaje de Anticuerpos Irregulares (AI) en el total de embarazadas estudiadas permitió detectar que en 5 de las pacientes Rh negativo, correspondiente a CIMYN, presentaban AI. Luego de la identificación y titulación de los AI, se corroboró que se trataban de Anticuerpos de especificidad Anti D. El título máximo alcanzado fue 8 en una paciente, el resto fue 2 pacientes Título 4 y 2 pacientes Título 2. En todos los casos las pacientes, fueron Rh negativo y se encontraban en el último trimestre de embarazo. Ver Tabla VII y Gráfico N° 7.

CIMYN	
Título AI: ANTI D	PORCENTAJE
Título 2	40
Título 4	40
Título 8	20

Tabla VII: Título de Anticuerpos Irregulares: Anti D.

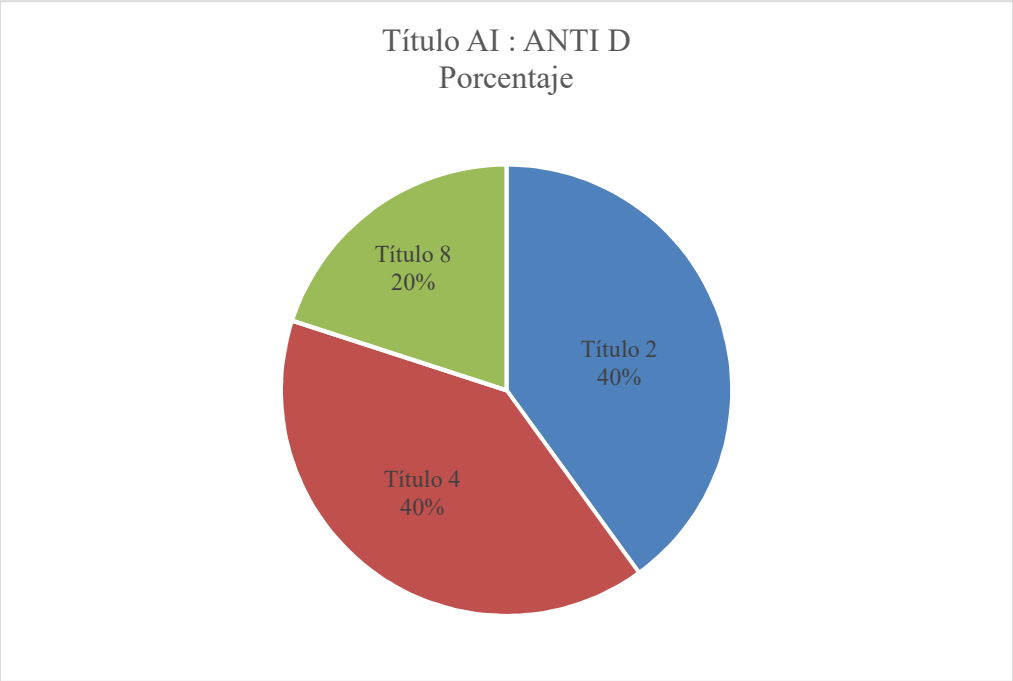


Gráfico Nº7: Título de Anticuerpos Irregulares.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

A través del estudio Inmunohematológico y los controles de toda gestante, se intenta abarcar todos los aspectos relacionados a la prevención de la EHP, establecer el diagnóstico, orientar el pronóstico, y seguimiento serológico ante la presencia de anticuerpos anti-eritrocitarios durante el embarazo con el objeto de identificar el feto que pueda necesitar tratamiento antenatal. Otra consideración a tener en cuenta en todo servicio de Medicina Transfusional, es tener previamente estudiada a la paciente para poder disponer de sangre compatible rápidamente ante emergencias obstétricas y neonatales, identificar adecuadamente a las mujeres Rh (D) negativo no sensibilizadas que pueden y deben beneficiarse de la administración profiláctica de Gammaglobulina anti-D (IgG anti-D).

Ante el diagnóstico de embarazo debe indicarse la evaluación inmunohematológica de toda paciente en el primer control de embarazo que debe incluir, independientemente de estudios realizados en embarazos previos. Entre las determinaciones a realizar encontramos el Grupo ABO, el mismo está considerado como uno de los más relevantes desde el punto de vista de la compatibilidad transfusional. En el presente estudio la frecuencia de Grupo Sanguíneo ABO demostró una mayor proporción de Grupo O, en segundo lugar de Grupo A, Grupo B y por último AB. Dicha frecuencia, es esperable para la población general y en concordancia con Spotti y col (26) en la paciente gestante ocurre con una frecuencia similar.

Por otro lado, se destaca la importancia del seguimiento inmunohematológico a toda gestante, tanto Rh positivo como en Rh negativo. Siendo el Antígeno Rh D Positivo el más prevalente en ambos centros de estudio, con 165 pacientes y 44 pacientes Rh D Negativo.

En referencia al resto de los antígenos del sistema Rh estudiados, expresados según genotipo más probable de Wiener, se hallaron en el total de las pacientes RhD Positivo 48 embarazadas R1r, 44 R1R2, 31 R1R1, 23 r2r, 15 R2R2, 2 RzR1y 2 Ror. En los pacientes Rh D Negativo, se hallaron 43 embarazadas rr y un caso r´r.

La detección de los Anticuerpos Irregulares en ambos centros de estudio, logró detectar la presencia de 5 pacientes con presencia de Anti D, de bajo título en todos los casos. El anti-D pasivo, puede ser detectado en el suero de las embarazadas hasta 12 semanas o más luego de la administración de la Gammaglobulina anti-D, dado que la Inmunoglobulina pasiva no puede ser diferenciada del aloinmune, se puede detectar en el estudio Inmunohematológico. Estos controles deberían ser efectuados inmediatamente después de la primera consulta obstétrica los efectos de conocer en forma temprana posibles sensibilizaciones y realizar los controles adecuados, o en su defecto en el curso de embarazo a toda paciente que no fue estudiada con anterioridad. La Pandemia por Covid-19, puso en evidencia la disminución de controles por parte de la paciente embarazada, lo que trajo aparejado que varias embarazadas asistieran a control en el último trimestre, en algunos casos inclusive luego de recibir la dosis de Gammaglobulina anti-D. Tal es el caso de las 5 pacientes que se analizaron en nuestro estudio, las cuales se incluyeron en el mismo a pesar de no encontrarse en el primer trimestre.

La inmunoprofilaxis con Inmunoglobulina Anti D en la embarazada RhD Negativo, ha disminuido en gran medida los casos de EHP, pero en nuestro país esta patología sigue siendo una importante causa de morbimortalidad fetal y neonatal.

Sin embargo, no todas las embarazadas Rh negativo no sensibilizadas reciben la dosis correspondiente. Es imperioso recordar, que no solo la mujer Rh D negativo puede estar en riesgo a desarrollar EHP, existen casos de sensibilización contra otros antígenos del sistema RH o incluso de otros sistemas tal es el caso de los antígenos del sistema KELL, DUFFY, KIDD entre otros que pueden llegar a ser gran significancia clínica. Tal como describen, Bonilla y col. (27) existe evidencia de casos descriptos de EHP por otros anticuerpos eritrocitarios. En nuestro estudio no se hallaron casos de embarazadas sensibilizadas por Anticuerpos Irregulares, lo que podría atribuirse de algún modo a la menor concurrencia de las gestantes a sus controles y la falta de un protocolo estricto que incluyan el estudio inmunohematológico entre los estudios básicos.

Las pacientes no siempre reciben la información adecuada de parte del equipo de salud. Teniendo en cuenta lo importante que resulta la falta de profilaxis porque el sistema sanitario no siempre lo provee o porque las condiciones económicas de las pacientes impiden obtenerla.

Podemos concluir, que resulta fundamental para el correcto diagnóstico, control, tratamiento y prevención de esta patología la integración de un equipo interdisciplinario formado por el obstetra, el neonatólogo y el especialista en Medicina Transfusional. A partir de ello, se puede procurar el apoyo de las autoridades de salud con el propósito de unificar criterios para el control y prevención, así como para generar medidas para que toda paciente embarazada pueda acceder al beneficio de la inmunoprofilaxis anti D.

BIBLIOGRAFÍA

1. Diamond LK, Blackfan KD, Batty JM. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. J Pediatr 1932;1:512-0.
2. Darrow RR. Icterus gravis neonatorum. Examination of etiologic considerations. Arch Pathol 1938;25:378-0.
3. Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for Rhesus blood. Proc Soc Exp Biol Med 1940;43:223-0.
4. Levine P. The role of isoimmunization in transfusion accidents in pregnancy and erythroblastosis fetalis. Am J Obstet Gynecol 1941;42:165-0.
5. Wallerstein H. The treatment of erythroblastosis fetalis by substitution transfusion. Blood 1948;3(2):170-9.
6. Allen FH, Diamond LK, Vaughan JC. Eryhtroblastosis fetalis: VI Prevention of kernicterus. Am J Dis Child 1950;80:779-91.
7. Allen FH Jr. Induction of labor in the management of erythroblastosis fetalis. Quatr Rev Pediat 1950;12:1-5.
8. Chown B, Bowmann WD. The place of early delivery in the prevention of fetal death from erythroblastosis. Pediatr Clin North Am 1958;00:279-85.
9. Cremer RJ, Perryman PW, Richards DH. Influence of light on the hiperbilirubinaemia of infants. Lancet 1958;1:1094-7.
10. Liley AW. Liquor amnii analysis in the management of the pregnancy complicated by RhDesus sensitization. Am J Obstet Gynecol 1961;82:1359-70.
11. Bevis DCA. The antenatal prediction of haemolytic disease of the newborn. Lancet 1952;1:395-8.
12. Liley AW. Intrauterine transfusion of the foetus in hae molytic disease. Br Med J 1963;2:1107-9.
13. Freda VJ, Gorman JG, Pollak W. Successfull prevention of experimental RhD immunization in man with gamma 2 globulin antibody preparation. Transfusion 1964;4:26-32.
14. Race RR. The RhD genotype and Fisher's theory. Blood 1948;3:27-42.
15. Simsek S, Fass BH, Bleeker PM. Rapid Rh D genotyping by polymerase chain reaction based amplification of DNA. Blood 1995;85:2975-80.
16. Lo YMD, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for non invasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998;62:768-75.
17. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. Transfusión 2002;42:1079-8.
18. Moise KJ. Management of Rhesus Alloimmunization in Pregnancy. Obstet Gynecol 2008;112:164-76.

19. Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem hemoglobin in den erythrozyten eines blu tausstriches. Klin Wochenschrift 1957;35:637-8.

20. Bowman JM, Pollok JM, Penston LE. Fetomaternal transplacental hemorrhage during pregnancy and after delivery. Vox Sang 1986;51:117-21.

21. Pollak W, Ascari WQ. Studies on RhD profilaxis. Relationship between doses of anti Rh and size of antigenic stimulus. Transfusion 1971;11:333-9.

22. Zipursky A, Israes LG. The pathogenesis and prevention of RhD immunization. Can Med Assoc J 1967; 97:1245-57.

23. Weiner K, Monagura A. Maternal alloimmunization and fetal hemolytic disease: Clinical Obstetrics The Fetus and Mother. Reece A and Hobbins JC 3d edition, Lippincot-Raven Publishers, 2007.

24. Nicolini U, Poblete A. Blood biochemistry of RhD (-) alloimmunized fetuses undergoing serial intravascular transfusions (comunicación personal).

25. Bowman JM. Controversies in Rh prophylaxis: who needs Rh immune globulin and when should it be given?. Am J Obstet Gynecol 1985;151:289-94.

26. Spotti, M, Rodriguez E, Rotbaum V, Barrera S, Villaravid N.Resultados inmunohematologicos en el Control obstétrico y neonatal de rutina. Sanatorio de la Trinidad de Palermo. XIV Congreso Arg. de Medicina Transfusional 2013

27. Bonilla ZR, Sánchez HR, Rivera LR, et al. Enfermedad hemolítica del recién nacido por anti-c y anti-E. Rev Mex Med Transfus. 2011;4(1):10-13.

TASA DE COBERTURA DE VACUNACIÓN CONTRA LA HEPATITIS B EN ARGENTINA

Diego Flichman

Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas
"Norberto Quirno" - CEMIC

ANTECEDENTES

La infección por el virus de la hepatitis B (HBV) y las complicaciones asociadas a la infección siguen siendo un importante problema de salud pública mundial. Aproximadamente 260 millones de personas están infectadas crónicamente y alrededor de 1 millón de muertes ocurren anualmente, la mayoría de ellas por complicaciones, como cirrosis y carcinoma hepatocelular. En Argentina, la prevalencia estimada de infección por HBV en donantes de sangre es de 1-2% con una distribución desigual en diferentes regiones del país y la tasa de infección en pacientes de 15 a 24 años es de 1.14 por 100,000. Además, los estudios prenupciales realizados en cuatro conglomerados urbanos en Argentina durante 2013 y 2014 mostraron una prevalencia de 0.26% de HBsAg. La vacunación universal es la estrategia más efectiva para disminuir la infección por el HBV. En Argentina, la vacuna contra el HBV se incorporó en el año 2000 para recién nacidos y en 2003 para niños de 11 años. Sin embargo, hay una escasez de datos sobre el nivel de protección contra la infección por HBV.

OBJETIVO

Determinar la prevalencia de anticuerpos seroprotectores anti-HBs (aHBs) en individuos de Argentina.

POBLACIÓN

Se recolectaron prospectivamente muestras de suero negativas para anti-HBc y HBsAg de 132 niños nacidos después del año 2000 y 762 hemodonantes que asistieron a cinco centros de donantes de sangre ubicados en las regiones Norte, Sur, Central, Este y Oeste de Argentina entre septiembre de 2019 y marzo de 2020.

Las muestras incluyeron 210 individuos nacidos después de 1992, alcanzados por la implementación de la vacuna en el año de 2003, y 552 individuos nacidos en 1992 o antes, no alcanzados por la implementación de la vacuna.

RESULTADOS

Se analizaron muestras de suero negativas para HBsAg y anti-HBc de 132 niños y 762 donantes de sangre, mayores de 18 años, de cinco centros de todo el país para detectar anticuerpos anti-HBs.

Se observaron títulos superiores a 10 mUI/ml en 74/132 niños (56,1%) y 336/762 (44,1%) donantes de sangre. La edad de los donantes de sangre fue de 33.9 (23-43), de los cuales 210 (27.6%) nacieron después de 1992 y, por lo tanto, fueron alcanzados por la implementación de la vacuna a los 11 años. Los donantes nacidos en 1992 o antes mostraron una frecuencia de protección significativamente menor (32.2%) en comparación con los donantes nacidos después de 1992 (75.23%), $p < 0.0001$. Además, se observaron diferencias significativas en el estado de la seroprotección entre los diferentes centros participantes ($p = 0,024$).

DISCUSIÓN

La OMS ha identificado diferentes objetivos que deberían contribuir a eliminar la hepatitis B como una amenaza para la salud pública. El objetivo principal incluye la vacunación universal, que es la estrategia más efectiva para lograr una disminución en la transmisión del VHB.

Para monitorear la efectividad de los planes de vacunación, por un lado, se debe estimar la tasa de cobertura de vacunación y, por otro lado, es aconsejable evaluar la prevalencia de HBs en la población. Este enfoque permitirá identificar los logros y las limitaciones de las campañas de vacunación, así como reconocer los inconvenientes y enfocar los recursos de acuerdo con las necesidades.

En general, los niveles de seroprotección fueron más bajos que los esperados, siendo adecuados para la población nacida entre los años 1992 y 2000, intermedia para la población alcanzada por la vacunación universal para recién nacidos desde el año 2000 y escasa para las personas nacidas antes de 1992. Vacunación infantil de rutina contra la hepatitis B, según la OMS, ha aumentado a nivel mundial con una cobertura del esquema completo estimado del 84% en 2017. Las personas a las que se llegó mediante la aplicación de la vacuna, ya sea al nacer (nacidos después de 2000) o ponerse al día a los 11 años (nacidos después de 1992) mostraron un tasa de títulos protectores en línea con la tasa de cobertura de la vacuna contra el VHB estimada por el Ministerio de Salud y la OMS.

Aunque no hubo diferencias en la tasa de seroprotección en términos de género o región geográfica en la cohorte de donantes nacidos después de 1992, en los nacidos en 1992 o antes, la tasa de seroprotección fue significativamente menor en la región central en comparación con otras regiones y en hombres en comparación con las mujeres. Esto último podría ser la consecuencia de una mayor conciencia de la población femenina como resultado de un control médico más cercano, particularmente en la edad de fertilidad.

Las bajas tasas de HBs protectores detectados en personas nacidas en 1992 o antes destacan la escasez de éxito para la iniciativa de vacunación de adultos, promovida en el año 2012, para fortalecer el control y la eliminación del VHB en Argentina. Este escollo está en línea con la alta frecuencia de infecciones recientes por VHB observadas en la población de donantes de sangre y la edad promedio de las personas diagnosticadas con

infecciones agudas por VHB. Estos resultados resaltan la necesidad de enfocar las campañas de vacunación en individuos que pertenecen a este grupo de edad.

CONCLUSIONES

La vacunación universal es la estrategia más eficaz para lograr una disminución de la transmisión del virus. En Argentina, la vacuna contra HBV ha sido incorporada al calendario en el año 2000 para recién nacidos y en 2003 para niños de 11 años (nacidos después de 1992). A partir del año 2012 es obligatoria para todas las personas de cualquier edad.

Los resultados preliminares sugieren que la inclusión de la vacuna contra HBV en el calendario en el año 2000 para recién nacidos y en 2003 para niños de 11 años ha sido efectiva en su implementación, logrando en la población nacida después del año 1992 una elevada frecuencia de anticuerpos e induciendo una respuesta protectora adecuada en el 63,9% de los casos. Los resultados observados sugieren que en la actualidad la población susceptible es aquella nacida en el año 1992 o con anterioridad. En consecuencia sería aconsejable enfocar las campañas de vacunación en ese grupo etario a fin de concientizarse para reducir el riesgo de trasmisión en la población.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen los primeros datos acerca de la frecuencia de aHBs en personas mayores de 18 años y contribuirán a la planificación del sistema de salud pública nacional. Por otro lado, son de utilidad para monitorear y evaluar la eficacia de las campañas y los planes de vacunación, así como también, para orientar futuros programas de inmunización contra el HBV en nuestro país.

ADELANTOS REALIZADOS EN LA INVESTIGACIÓN DURANTE EL PERIODO DEL PRESENTE INFORME

Los resultados preliminares obtenidos han sido enviados y aceptados para su comunicación en forma de poster en la siguiente reunión internacional y como manuscrito en la revista Vaccine:

- XI Congreso del Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional (GCIAMT), Punta del Este, Uruguay 24 al 26 de octubre. Prevalencia de anti-HBs protectivos en hemodonantes de Argentina Di Lello F, Blejer J, Alter A, Bartoli S, Vargas F, Acevedo ME, Fernandez R, Ruiz R, Corvalan J, Galli C, Blanco S, Gallego S, Martinez, F, Flichman D.
- Hepatitis B surface antibodies seroprevalence among people born before and after implementation of universal HBV vaccination in Argentina. Di Lello F A, Blejer J, Alter A, Bartoli S, Vargas F, Ruis R, Galli C, Blanco S, Gallego S, Fernandez R, Martínez AP, Flichman DM. Vaccine 2020; 10;38:2678-2682; ISSN 0264-410X.

INFECCIÓN POR POLIOMAVIRUS JC Y BK EN TRASPLANTADOS DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA, ARGENTINA

María Celia Frutos [1], Noelia Maldonado [1], Nubia Yandar Barahona [1], Marcos Balangero [1], Sebastián Blanco [1], Gonzalo Castro [2], Paola Sicilia [2], Gabriela Barbas [2], Sandra Gallego [1]

[1] Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. [2] Área de Biología Molecular. Laboratorio Central de la Provincia. Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba

INTRODUCCIÓN

Los Poliomavirus JCV y BKV son virus de distribución mundial y la infección es especie específica, siendo los seres humanos los hospederos naturales. Estos virus ingresan al hombre a través de distintas vías: respiratoria, fecal-oral, uro-oral, transfusional o transplacentaria (Garces, 2010; Knowles, 2006) y posteriormente hacen persistencia en diferentes tejidos como riñones, cerebro y sistema linfático (Stolt et al, 2003). La infección primaria es benigna y asintomática, y ocurre normalmente en la infancia. Se estima que alrededor del 70% al 90% de la población mundial está infectada y posee anticuerpos específicos (Antonsson et al, 2010; Garces, 2010).

El virus JC es el agente etiológico de la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), enfermedad desmielinizante del SNC causada por la infección lítica de los oligodendrocitos (White y Khalili, 2005).

La mayoría de los casos de LMP han sido diagnosticados en pacientes con SIDA. Sin embargo, la LMP también puede aparecer en la inmunosupresión farmacológica después del trasplante de órganos. Así, la misma fue descripta en trasplantados renales, de pulmón, de hígado, corazón y trasplante alogénico de médula ósea (Mateen et al, 2011; Ouwens et al, 2000; Sauer et al, 2017; Shitrit et al, 2003).

En el paciente que recibe un trasplante, la infección puede condicionar la supervivencia del paciente y del injerto. La enfermedad por Citomegalovirus, a pesar de los avances en las medidas de prevención, sigue siendo la infección viral más frecuente. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito la infección por virus BK como una causa mayor de pérdida del injerto (Cervera y Moreno, 2007).

BKV está asociado con cistitis hemorrágica, pancreatitis, obstrucción renal, uretritis nefropatías y encefalitis en individuos trasplantados de células madre hematopoyéticas, en trasplantados renales, de médula ósea y en individuos inmunodeprimidos (Garces, 2010; Kinnaird y Anstead, 2010; Moal et al, 2013). La nefropatía asociada a el virus BK puede ocurrir en el 1% al 10% de los pacientes trasplantados renales y puede producir la pérdida del órgano trasplantado en el 30% hasta el 80% de los casos (Costa y Cavallo, 2012; Hirsch et al, 2005). Existen factores de riesgo para el desarrollo de nefropatía asociada a BK, los cuales dependen del paciente (género, estatus serológico, edad, estado

inmunológico), del órgano trasplantado (mismarch de HLA, infección latente, estado de daño/regeneración) y de las características de la cepa viral involucrada (Hirsch, 2003).

La realización del diagnóstico de infección por el virus BK en trasplantados renales es importante para poder diferenciar las causas del rechazo del trasplante, ya que el rechazo agudo al trasplante es a veces confundido en infecciones por BK. Esto es fundamental, ya que de ello depende las decisiones terapéuticas, si se trata de rechazo agudo se debe aumentar la terapia inmunosupresora, mientras que en la infección por BK la conducta a seguir es disminuir la inmunosupresión para que el propio sistema inmunológico pueda controlar la infección viral (Brennan et al, 2005; Ginevri et al, 2007; Ramos et al, 2009).

Ha sido descripta previamente la infección por JCV y BKV en Argentina en pacientes trasplantados adultos (Schiavelli et al, 2014; Marinic et al, 2014) y pacientes trasplantados pediátricos (Bonaventura et al, 2005) en provincias como Buenos Aires y Chaco. Sin embargo, se desconoce la situación en los grupos de trasplantados de nuestra provincia. El conocimiento de la frecuencia y distribución de estas infecciones en dicha población, facilitará la toma de decisiones para la incorporación sistemática del diagnóstico de poliomavirus en el control de rutina de estos pacientes, para un manejo terapéutico óptimo.

Por ello el objetivo de este trabajo fue detectar la infección con los poliomavirus JC y BK en individuos trasplantados que fueron estudiados para CMV y/o Epstein Barr en los controles de rutina, en el periodo 2016-2017 en Córdoba. Asimismo, caracterizar la epidemiología de las infecciones por JC y BK en los trasplantados en Córdoba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 68 muestras de plasma de pacientes trasplantados que ingresaron al Laboratorio Central de Provincia en el año 2016-2017, para el diagnóstico de infección por citomegalovirus (CMV) y/o por virus Epstein Barr (EBV).

De las 68 muestras analizadas, el 70.6 % fueron de género masculino y 29,4 % de género femenino. La media de edad fue de 30 años, con un rango etario de 1 año a 66 años. Del total de pacientes estudiados en el 72% (49/68) de los mismos pudimos obtener el dato del tipo de trasplante recibido. El 51% (5/49) de los trasplantes correspondieron a trasplantados renales, el 34.7% (17/49) fueron de medula ósea, el 10.2% (5/49) de hígado y el 4.08% trasplantados cardiacos.

La extracción de ácidos nucleicos se realizó a partir de las muestras de plasmas utilizando el kit comercial High Pure Template kits (Roche), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Para la detección de poliomavirus se utilizó una PCR para la amplificación de un fragmento de 173 pb de la región del antígeno T (LT) que es compartida por los virus JCV y BKV (Fink et al, 2006).

Los oligonucleótidos se seleccionaron de acuerdo al protocolo previamente descripto por Fink y col. 2006. Los oligonucleótidos seleccionados fueron PEP 1 (AGT CTT TAG GGT CTT CTAC) y PEP 2 (GGT GCC ACC TAT GGA ACA G).

A partir de 10 µl del extracto de ADN la reacción se realizó en volumen final de 50 µl en presencia de 10 µM de los respectivos oligonucleótidos, 200 µM de dNTPs, Buffer 1x, 1,5 mM $MgCl_2$, y 1,5 unidades de enzima Gotaq polimerasa (PROMEGA, Madison, WI USA).

La reacción constó de una etapa de desnaturalización inicial a 95ºC durante 10 minutos, 40 ciclos a 94ºC durante 1,5 minutos, a 55ºC durante 1,5 minutos y a 72ºC durante 2 minutos, seguido por una etapa de extensión final a 72ºC por 7 minutos, y fue realizada en un termociclador UNO II (Biometra, Alemania).

La tipificación viral se realizó mediante la digestión de las muestras positivas para Antígeno T de Poliomavirus, utilizando la enzima de restricción BAMH I, siguiendo el protocolo previamente descripto por Arthur y colaboradores 1989.

Las muestras positivas para antígeno T fueron sometidas a otras dos PCR utilizando cebadores complementarios a la proteína de la cápside, VP1. Para el virus JC se amplifico un fragmento de 215 pb y para el virus BK uno de 353 pb, según protocolos descriptos por Nali et al, 2012; utilizando los cebadores JLP-15 (5´- ACA GTG TGG CCA GAA TTC ACT ACC-3´) y JLP-16 (5´- TAA AGC CTC CCC AAC AGA AA-3´). Para BKV se utilizaron los cebadores BKV1 (5´- GAA GTT CTA GAA GTT AAA ACT GGG- 3´) y BKV2 (5´- GTG GAA ATT ACT GCC TTG AAT AGG- 3´).

Los fragmentos de ADN fueron amplificados en un volumen final de 50 µl, conteniendo 10 µl del extracto de ADN, Buffer 1x, 200 µM de dNTPs, 0,2 µM de cada cebador, 1,5 mM $MgCl_2$, 1,5 U/reacción de la enzima GoTaq polimerasa (PROMEGA, Madison, WI USA).

La reacción se realizó de la siguiente manera: desnaturalización del ADN con un ciclo de 5 minutos a 95ºC, seguido de 50 ciclos a 95ºC por un minuto, 63ºC por 1,5 minutos y 72ºC por un minuto, y finalmente 10 minutos a 72ºC la extensión.

Los productos de PCR y Nested-PCR se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% con 0,5 µl/ml de Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA). Para la determinación del peso molecular de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador de peso molecular 100 pb (PBL, Argentina).

La visualización y el análisis de los productos amplificados se realizó con un documentador de geles BioDoc-ItTM (UVP, USA).

El ADN correspondiente a los productos esperados fue extraído del gel y purificado a partir de la banda, empleando el Kit de Extracción (Qiagen, Valencia, Ca, USA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Posteriormente, el ADN (4 µl) purificado fue sometido a una nueva corrida electroforética conjuntamente con un marcador de peso molecular- low DNA MASS ladder (Life Technologies, USA)- que permite establecer la cantidad (ng/ul) aproximadamente de ADN presente en la muestra pre-secuenciación.

El ADN purificado (150 ng/ul) fue enviado a secuenciar a MACROGEN (Macrogen, Inc. Seúl, Corea).

Una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos amplificados, las mismas fueron editadas utilizando el programa BioEdit v 7.0.9 (Hall, 1999) y fueron alineadas juntas con las secuencias obtenidas del banco de datos del NCBI utilizando el programa Clustal X 2.12 (Larkin et al, 2007). Las secuencias fueron caracterizadas mediante análisis con 2.2.19 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Para seleccionar el modelo de sustitución de nucleótidos adecuado se utilizó el programa jModelTest v 0.1.1 (Posada, 2008). Las relaciones filogenéticas de las secuencias obtenidas fueron evaluadas por la metodología de máxima verosimilitud con PhyML 3.0 para Linux (Guindon y Gascuel, 2003). Se utilizó un bootstrap con 1000 pseudo-replicas para proporcionar mayor confiabilidad a los valores de los agrupamientos. Los dendogramas se prepararon mediante el módulo Tree Explorer del programa MEGA 4 (Tamura et al, 2007).

RESULTADOS

Un total de 68 muestras de plasma de personas trasplantadas fueron estudiadas para poliomavirus BK y JC en los años 2016-2017, de las cuales el 25% (17/68) resultaron positivas por PCR para la región de LT compartida por ambos poliomavirus. De las 17 muestras positivas por PCR para LT, 11 muestras fueron de pacientes masculinos y 6 de pacientes femeninos, con una media de edad de 21,97 años (1-63 años).

De las muestras correspondientes al año 2016, 7/31 (22,6 %) resultaron positivas para Poliomavirus por la PCR dirigida al Antígeno T. De las 37 muestras analizadas correspondientes al año 2017, 10/37 (27 %) resultaron positivas para Poliomavirus por PCR.

De las 7 muestras positivas para Poliomavirus del año 2016, 4 correspondieron a BKV y 3 a JCV. En los cuatro pacientes que se detectó BKV, dos habían recibido trasplante de medula ósea y en los dos restantes no se pudo obtener el dato de que órgano habían recibido. Mientras que en los pacientes en los que se detectó JCV, los tres pacientes habían recibido trasplante renal.

En las muestras positivas del año 2017 se determinó la presencia de BKV en cinco pacientes trasplantados y JCV en 5 pacientes. De los pacientes en los que se detectó BKV, cuatro de ellos habían recibido trasplante renal y uno de medula ósea. JCV fue detectado en tres pacientes que recibieron trasplante de medula ósea, uno trasplante renal y en uno de los pacientes no se pudo obtener datos del trasplante recibido.

En 10 muestras de plasma de los trasplantados se pudo amplificar la región de VP1 de JCV, cinco de ellos habían recibido trasplante renal, 4 trasplante de medula ósea y un paciente no se obtuvo el dato del trasplante recibido.

El análisis de las secuencias de la región de VP1 de JCV de los pacientes trasplantados mostró una alta homología entre sí, pertenecieron al genotipo 2A y además, agruparon con secuencias descriptas previamente en nuestro país (MK477566; KT354797) (Figura 1).

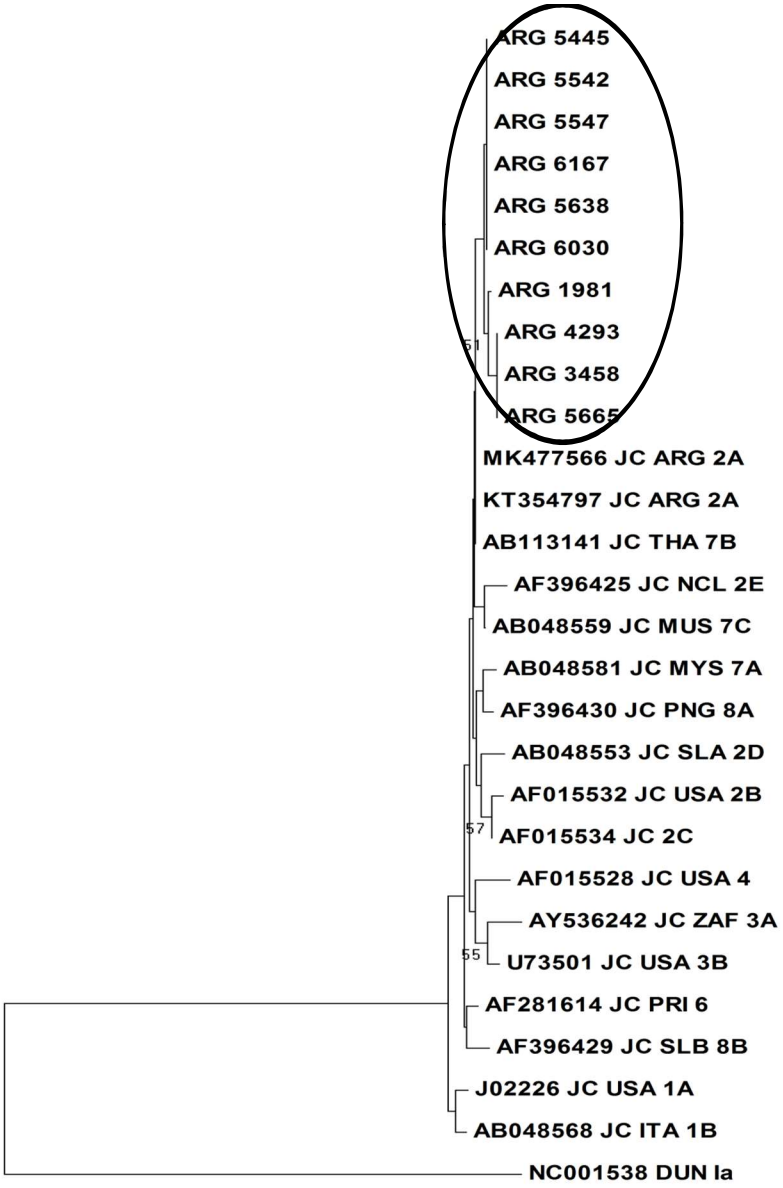


Fig. 1: Dendograma de máxima verosimilitud para las secuencias de VP1 de JCV. Se construyó usando HKY+G como modelo de sustitución de nucleótidos con parámetros sugeridos por ModelTest 3.7 (software PhyML). 1000 pseudoreplicas. Solo los bootstrap>50 se muestran en los nodos. Las cepas que pertenecen a este estudio comienzan con ARG y están circunscriptas por el círculo. La secuencia NC001538 DUN de BKV fue utilizada como extragrupo.

En tres de las muestras de plasma estudiadas se pudo amplificar la región de VP1 de BKV. Uno de los pacientes en los que se detectó VP1 había recibido trasplante renal, otro de los pacientes había recibido trasplante de medula ósea, mientras que el tercer paciente no se obtuvo datos.

Las secuencias de VP1 de BKV obtenidas de los pacientes trasplantados agruparon con la secuencia patrón de BKV (Fig. 2). El genotipo de las secuencias de este estudio corresponde al genotipo IA y presentaron una alta homología con respecto a la secuencia patrón para BKV (DUNLOP).

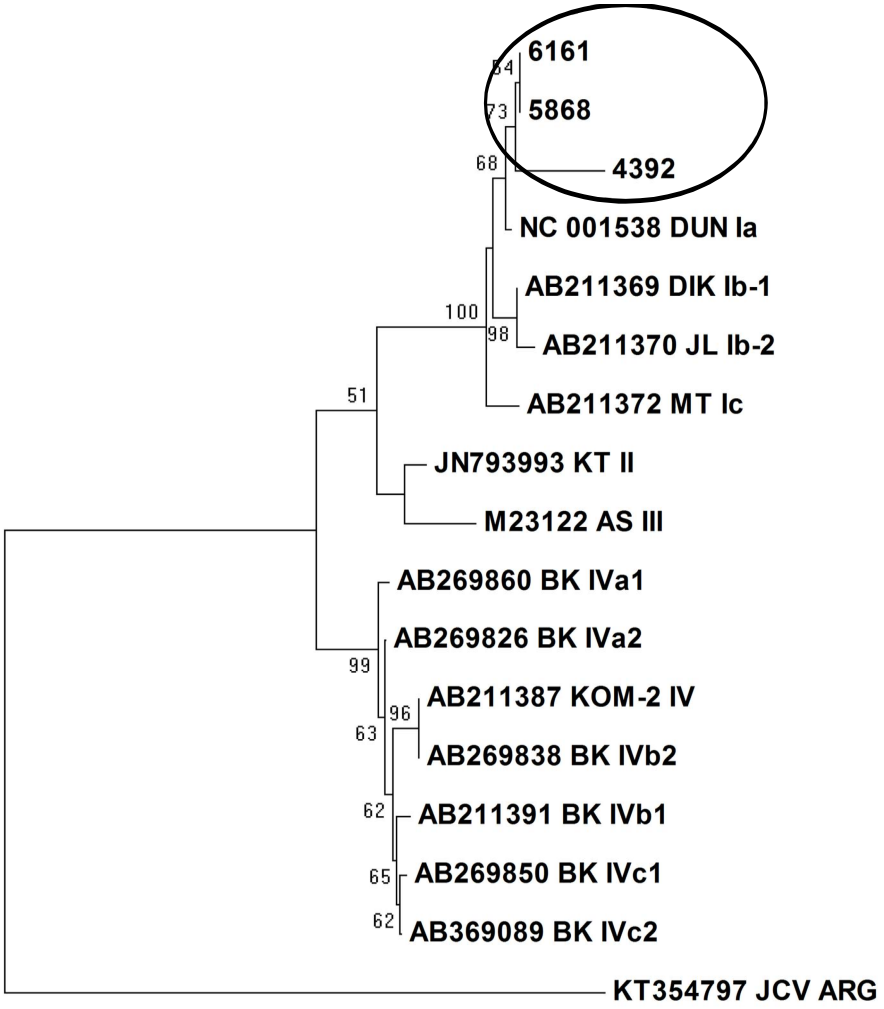


Fig. 2: Dendograma de máxima verosimilitud para las secuencias de VP1 de BKV. Se construyó usando TPM3 uf+G como modelo de sustitución de nucleótidos con parámetros sugeridos por ModelTest 3.7 (software PhyML). Las cepas que pertenecen a este estudio comienzan con ARG y están circunscriptas por el círculo. 1000 pseudoreplicas. Los bootstrap>50 se muestran en los nodos. La secuencia KT354797 JCV ARG fue utilizada como extragrupo.

DISCUSIÓN

En las últimas décadas ha habido un aumento de pacientes con inmunosupresión, tanto por causas infecciosas, trasplantes y/o como por el empleo de nuevos tratamientos biológicos. Los poliomavirus se han comportado como patógenos emergentes en este tipo de pacientes (Cervera y Moreno, 2007; Martínez et al, 2016).

Los poliomavirus fueron detectados en el 25% (17/68) de los pacientes trasplantados estudiados, en concordancia con otro estudio que reporto una prevalencia en suero de LT de poliomavirus del 21% (42/200) en pacientes trasplantados renales de Kuwait (Chehadeh et al, 2013). De la misma manera que lo reportado por otros autores, los polyomavirus fueron detectados en mayor proporción en pacientes masculinos (Chedahed et al, 2013; Schold et al, 2009; Toan et al, 2019).

Los estudios realizados en trasplantados se centran principalmente en la búsqueda de BKV en orina de personas trasplantadas renales, debido a que algunos autores reportan que la viruria estaría relacionada con estenosis uretrales, nefritis intersticial y fallo del injerto en pacientes trasplantados renales, y con cistitis hemorrágica en trasplantados de médula ósea (Hirsch 2003; Leung et al, 2001; Bogdanovic et al, 2004; Wong et al, 2007). La viruria aparece antes que la viremia, pero se ha determinado que la viremia posee una especificidad y un valor predictivo positivo mayor (Cesaro et al, 2009; Erard et al, 2005). Asimismo, la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas en Trasplantados recomienda la detección en pacientes trasplantados de la viremia por el virus BK, entre los 6 meses y 1 año pos trasplante (Hirch y Randhawa, 2019).

De la misma manera que BKV, numerosos estudios han centrado la búsqueda de JCV en trasplantados en muestras de orina, sin embargo la asociación entre la viruria de JCV y el rechazo del trasplante no ha sido demostrado (Delbue et al, 2013).

Nuestro estudio detecto la presencia de JCV en plasma en una prevalencia del 11,7% (8/68) y de BKV del 13,2% (9/68). Resultados similares fueron descritos por otros autores, sin embargo, son pocos estudios que reportan la presencia de ambos poliomavirus en esta población. Chehadeh y colaboradores reportó una prevalencia en suero en trasplantados renales del 13% JCV y 8% BKV en Kuwait, mientras que en otros estudios se describen prevalencias muy diferentes. Así, Madhavan y colaboradores, reportó una viremia por BKV de 10% (13/130) y de JCV del 0,77% (1/130) en personas trasplantadas renales en India, mientras que Herman y colaboradores reportaron una viremia por BKV del 11% (5/46) en pacientes trasplantados renales pediátricos de Bélgica, sin embargo en dichos estudios no pudieron detectar viremia por JCV (Chehadeh et al, 2013; Madhavan et al, 2015; Herman et al, 2004). Huang y colaboradores en China detectaron una viremia de 11,6% de JCV (8/69) y de 62,3% (43/69) de BKV en pacientes trasplantados renales con nefropatía por poliomavirus, mientras que en trasplantados renales sin el desarrollo de nefropatía, los autores reportaron una viremia por BKV de 7% (7/127) y no detectaron viremia por JCV en este grupo de trasplantados (Huang et al, 2020).

Resultados similares de viremia por BKV fueron reportados por otros autores; Grellier y colaboradores reportaron una viremia por BKV del 12,4% (15/121) en pacientes trasplantados renales adultos de Francia (Grellier et al, 2018), Funahashi y colaboradores en Japón detectaron una viremia por BKV del 13,3% en trasplantados renales (36/270) (Funahashi et al, 2014), mientras que Hirsch y col. también reportaron una prevalencia en plasma de BKV del 12,8% (10/78) en pacientes adultos trasplantados de Suiza (Hirsch et al, 2002).

Nuestros resultados son concordantes con los escasos datos preexistentes en Argentina en otros grupos. En un estudio realizado en Buenos Aires detectó una viremia de BKV del 12,12% (8/66) en pacientes trasplantados renales, similar a la viremia detectada en nuestro estudio (Cobos et al, 2017). Mientras que en otro estudio realizado en Chaco se reportó una de viremia por BKV de 7,1% (5/70) en pacientes trasplantados renales con viruria persistente por BKV (Marinic et al, 2014).

Si bien existen reportes de nefropatía por el virus JC en personas trasplantadas (Kazory et al, 2003; Wen et al, 2004; Kantarci et al, 2011; Lautenschlager et al, 2014; Randhawa et al, 2001), así como también LMP en pacientes trasplantados (Shitrit et al, 2003; Mateen et al, 2011; Ouwens et al, 2000; Waggoner et al, 2009; Ishii et al, 2019), son pocos los reportes de detección de viremia por JCV en trasplantados.

La viremia de JCV (11,7%) encontrada en este estudio concuerda con lo descrito por Drachenberg y colaboradores en sangre de trasplantados renales adultos de EEUU (14,2 %; 15/103).

En un estudio de seguimiento realizado en Francia mostró una prevalencia de JCV de 6,8% (7/103) en muestras de sangre entera de trasplantados renales, además cuatro pacientes también presentaron infección con BKV (Mengelle et al, 2011), lo que demuestra la importancia de la detección de ambos poliomavirus en esta población.

En nuestro país solo existe un reporte de la presencia de JCV en pacientes trasplantados, sin embargo dicha detección fue realizada en orina (Frangi et al, 2015). Por lo que nuestra detección es el primer reporte de viremia por JCV en pacientes trasplantados de Córdoba y Argentina. Nuestros resultados demuestran que es necesaria la determinación de ambos poliomavirus en esta población y su incorporación tanto en el algoritmo diagnostico como en el seguimiento de estos pacientes. Esto último es importante a tener en cuenta considerando el contexto actual de los pacientes trasplantados, quienes transitan tiempos de inmunosupresión prolongados, lo cual aumenta el riesgo de reactivación de los poliomas y, por lo tanto, el riesgo de rechazo del órgano trasplantado.

En nuestro estudio detectamos el genotipo 2 de JCV en plasma de los pacientes trasplantados, el cual se ha asociado con una mayor probabilidad de desarrollar LMP en pacientes inmunodeprimidos (Dubois et al, 2001). Este genotipo había sido descrito previamente en nuestro país en orina de nativos Americanos (Sanabria et al, 2019). Asimismo este genotipo se lo ha detectado en muestras de líquido cefalorraquídeo de personas inmunosuprimidas (Agostini et al, 1997; Agostini et al, 1998).

El genotipo I de BKV es el más prevalente y extendido en todo el mundo (aproximadamente 80%), seguido por el genotipo IV (aprox. 15%), los genotipos II y III son raros en todas las regiones geográficas (aprox. 5 %) (Zheng et al, 2007; Luo et al, 2008, Luo et al, 2012). Estudios epidemiológicos demostraron que existen distribuciones geográficas de subgrupos dentro del genotipo BKV-I, con predominio de Ia en África, Ib-1 en el sureste de Asia, Ib-2 en Europa e Ic en el noreste de Asia (Zhong et al, 2009). Sin embargo en un estudio en Brasil, informó la presencia de los subtipos Ia e Ib-1 en trasplantados renales con insuficiencia renal (Varella et al, 2018). Asimismo, son escasos los estudios sobre la asociación de genotipos específicos de BKV y el riesgo, curso y gravedad de la infección asociada a BKV después del trasplante. Se ha demostrado que el genotipo I replica más eficiente que el genotipo IV en células epiteliales renales humanas in vitro (Nukuzuma et al, 2006), lo que posiblemente sugiere una infección más eficiente in vivo. Existen reportes que informaron asociaciones entre el desarrollo de nefropatía por BKV y los genotipos I y IV (Varella et al, 2018; Baksh et al, 2001; Boukoum et al, 2016; Gosert et al, 2008; Yogo et al, 2009).

En nuestro estudio todas las muestras de plasma correspondieron al genotipo I de BKV, en concordancia con lo reportado por otros autores (Boukoum et al, 2016; Wunderink et al, 2019; Chehadeh et al, 2013; Madhavan et al, 2015, Tremolada et al, 2010; Matsuda et al, 2011; Luo et al, 2012; Cobos et al, 2018). Este genotipo ha sido descrito también en nuestro país en muestras de orina de personas trasplantadas y en muestras de aguas residuales de Argentina (Torres et al, 2016; Cobos et al, 2018).

Nuestros resultados y los resultados previamente descrito por otros autores demuestran la necesidad ampliar los estudios de detección de BKV en esta población, de manera de brindar herramientas para las decisiones terapéuticas. Asimismo, Degener et al, 1997 postuló que la sola detección de secuencias de VP1 de poliomavirus en sangre estaría relacionada con una infección reciente, por lo que nuestros resultados representan el primer hallazgo de infección activa/reactivación de JCV y BKV en trasplantados de Córdoba.

Los pacientes trasplantados con reactivación de poliomavirus presentan un mayor riesgo de desarrollar patologías que pueden llevar al rechazo parcial o total del injerto (Cervera y Moreno, 2007). No existe tratamiento específico para las reactivaciones por poliomavirus y debido a que el tratamiento de rechazo agudo implica un aumento de la inmunosupresión, y la replicación viral requiere una disminución de la inmunosupresión, es imprescindible contar con herramientas sensibles y específicas que contribuyan a determinar un diagnóstico preciso.

Los pacientes trasplantados con reactivación de poliomavirus presentan un mayor riesgo de desarrollar patologías que pueden llevar al rechazo parcial o total del injerto[12]. No existe tratamiento específico para las reactivaciones por poliomavirus y debido a que el tratamiento de rechazo agudo implica un aumento de la inmunosupresión, y la replicación viral requiere una disminución de la inmunosupresión, es imprescindible determinar un diagnóstico preciso y precoz.

El presente estudio aporta los primeros datos epidemiológicos y moleculares sobre la prevalencia de BKV y JCV en plasma de trasplantados de Córdoba. Nuestro estudio es un avance en el conocimiento científico en un tema de importancia como es la investigación de enfermedades infecciosas y su impacto en trasplantados de nuestro medio. Consideramos que estos conocimientos deberían ser tomados en cuenta para la toma de decisiones en el manejo terapéutico de dichos pacientes para mejorar la calidad de vida de las personas afectadas.

REFERENCIAS

- Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Mory R, Singer EJ, Stoner GL. JC virus (JCV) genotypes in brain tissue from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) and in urine from controls without PML: increased frequency of JCV type 2 in PML. J Infect Dis 1997; 176:1–8.
- Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Singer EJ, Baumhefner RW, Stoner GL. JC virus type 2B is found more frequently in brain tissue of progressive multifocal leukoencephalopathy patients than in urine from controls. J Hum Virol 1998; 1:200-6.
- Antonsson A, Green AC, Mallitt KA, O'Rourke PK, Pawlita M, Waterboer T, Neale RE. Prevalence and stability of antibodies to the BK and JC polyomaviruses: a long-term longitudinal study of Australians. J Gen Virol 2010; 91:1849-53.
- Arthur RR, Dagostin S, Shah KV. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989; 27(6):1174-9.
- Baksh FK, Finkelstein SD, Swalsky PA, et al. Molecular genotyping of BK and JC viruses in human polyomavirus-associated interstitial nephritis after renal transplantation. Am J Kidney Dis 2001; 38:354–65. 32.

- Bischof N, Hirsch HH, Wehmeier C, et al. Reducing calcineurin inhibitor first for treating BK polyomavirus replication after kidney transplantation: long-term outcomes. Nephrol Dial Transplant 2019; 34:1240-1250.
- Bogdanovic G, Priftakis P, Giraud G, Kuzniar M, Ferraldeschi R, Kokhaei P, et al. Association between a high BK virus load in urine samples of patients with graft-versus-host disease and development of hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. J Clin Microbiol 2004; 42:5394–5396.
- Bonaventura R, Vázquez A, Exeni A, Rivero K, Freire MC. Infección por virus BK en paciente pediátrico trasplantado renal. Rev Argent Microbiol 2005; 37(3): 153-155.
- Boukoum H, Nahdi I, Sahtout W, et al. BK polyomavirus genotypes and nephropathy: is there a relationship? Transpl Infect Dis 2016; 18:309–11.
- Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, Torrence S, Schuessler R, Roby T, Gaudreault-Keener M, Storch GA. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. Am J Transplant 2005; 5:582–594.
- Cesaro S, Hirsch HH, Faraci M, Owoc-Lempach J, Beltrame A, Tendas A, et al. Cidofovir for BK Virus-Associated Hemorrhagic Cystitis: A Retrospective Study. Clin Infect Dis 2009; 49(2):233-40.
- Cervera C, Moreno A. Infecciones en el paciente con trasplante renal y pancreático Enferm Infecc Microbiol Clin 2007; 25(5):345-55.
- Chehadeh W, Nampoory MR. Genotypic diversity of polyomaviruses circulating among kidney transplant recipients in Kuwait. J Med Virol 2013; 85(9):1624-31.
- Cobos M, Aquilia L, Garay E, Ochiuzzi S, Alvarez S, Flores D, Raimondi C. Epidemiologic Study and Genotyping of BK Virus in Renal Transplant Recipients. Transplant Proc 2018; 50: 458-460.
- Costa C, Cavallo R. Polyomavirus-associated nephropathy. World J Transplant. 2012; 2(6):84-94.
- Delbue S, Ferraresso M, Ghio L, Carloni C, Carluccio S, Belingheri M, Edefonti A, Ferrante P. A review on JC virus infection in kidney transplant recipients. Clin Dev Immunol 2013; 2013:926391.
- Degener AM, Pietropaolo V, Di Taranto C, Rizzuti V, Ameglio F, Cordiali Fei P, Caprilli F, Capitanio B, Sinibaldi L, Orsi N. Detection of JC and BK viral genome in specimens of HIV-1 infected subjects. New Microbiol 1997; 20(2), 115–122.
- Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Gosert R, Wali RK, Munivenkatappa R, Nogueira J, Cangro CB, Haririan A, Mendley S, Ramos E. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. Transplantation 2007; 84(3):323-30.
- Dubois V, Moret H, Lafon ME, Brodard V, Icart J, Ruffault A, Abbed K, Dussaix E, Ingrand D. JC virus genotypes in France: molecular epidemiology and potential significance for progressive multifocal leukoencephalopathy. J Infect Dis 2001; 183(2):213-17.

- Erard V, Kim HW, Corey L, Limaye A, Huang M-L, Myerson D, et al. BK DNA viral load in plasma: evidence for an association with hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. Blood 2005; 106:1130–1132.
- Fink MC, Penalva de Oliveira AC, Milagres FA, Vidal JE, Picerno-Pouza AF, Duarte Neto A, Pannuti CS.JC virus DNA in cerebrospinal fluid samples from Brazilian AIDS patients with focal brain lesions without mass effect. J Infect 2006; 52(1):30-6.
- Frangi E, Díaz de Arce H, Livellara B, Oyhamburu J. Infeccion por el virus JC en receptores de trasplante renal. XI Congreso Argentino de virología. II Congreso Latinoamericano de Virología (2015-06) – 2015.
- Funahashi Y, Kato M, Fujita T, Takai S, Kimura Y, Gotoh M. Prevalence of polyomavirus positivity in urine after renal transplantation. Transplant Proc 2014; 46(2):564-6.
- Garces JC. BK Virus-Associated Nephropathy in Kidney Transplant Recipients. Ochsner J 2010; 10:245–9.
- Guindon S, Gascuel O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. Syst Biol 2003; 52(5):696-704.
- Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, Basso S, Fontana I, Cioni M, Bodaghi S, Salotti V, Rinieri A, Botti G, Perfumo F, Locatelli F, Comoli P. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. Am J Transplant 2007; 7, 2727–2735.
- Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, et al. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. J Exp Med 2008; 205:841–52.
- Grellier J, Hirsch HH, Mengelle C, Esposito L, Hebral AL, Belliere J, Weissbach F, Izopet J, Del Bello A, Kamar N. Impact of donor BK polyomavirus replication on recipient infections in living donor transplantation. Transplant Infect Dis Off J Transpl Soc 2018; 20, e12917.
- Hall TA. BioEdit A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 1999; 41: 95-98.
- Herman J, Van Ranst M, Robert Snoeck R, Kurt Beuselinck K, Lerut E, Van Damme-Lombaerts R. Polyomavirus infection in pediatric renal transplant recipients: evaluation using a quantitative real-time PCR technique. Pediatr Transplant 2004; 8(5):485-92.
- Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, Steiger J. Prospective Study of Polyomavirus Type BK Replication and Nephropathy in Renal-Transplant Recipients. N Engl J Med 2002; 347: 488-496.
- Hirsch HH. BK virus replication and disease in solid organ transplant recipients: an update. Curr Opin Organ Transpl 2003; 8: 262-268.
- Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, Mihatsch MJ, Nickeleit V, Ramos E, Randhawa P, Shapiro R, Steiger J, Suthanthiran M, Trofe J. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. Transplantation. 2005; 79(10):1277-86.

- Hirsch HH, Vicenti F, Friman S, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, et al. Polyomavirus BK replication in de novo kidney transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine: a prospective, randomized, multicenter study. Am J Transplant 2013; 13:136-45.
- Hirsch HH, Randhawa PS. BK polyomavirus in solid organ transplantation Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. Clin Transplant 2019:e13528.
- Höcker B, Schneble L, Murer L, et al. Epidemiology of and risk factors for BK polyomavirus replication and nephropathy in pediatric renal transplant recipients: an international CERTAIN registry study. Transplantation 2019; 2018:1-39.
- Huang G, Huang Y, Chen X, et al. Effect of JC virus on polyomavirus nephropathy in renal transplant recipients. Effect of JC virus on polyomavirus nephropathy in renal transplant recipients. Transplantation 2020; 104(3): 460-461.
- Ishii K, Yamamoto F, Homma S, et al. Probable progressive multifocal leukoencephalopathy-immune reconstitution inflammatory syndrome with immunosuppressant dose reduction following lung transplantation: a case report and literature review. BMC Neurol 2019; 19: 263.
- Kantarci G, Eren Z, Demirag A, Dogan I, Cakalagaoglu F, Yilmaz G. JC virus-associated nephropathy in a renal transplant recipient and comparative analysis of previous cases. Transplant Infect Dis 2011; 13: 89-92.
- Kazory A, Ducloux D, Chalopin JM, Angonin R, Fontaniere B, et al. The first case of JC virus allograft nephropathy. Transplantation 2003; 76: 1653-5.
- Kinnaird AN, Anstead GM. Hemorrhagic cystitis and possible neurologic disease from BK virus infection in a patient with AIDS. Infection 2010; 38:124-7.
- Knowles WA. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). Adv Exp Med Biol 2006; 577:19-45.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ. Bioinformatics 2007; 23:2947-48.
- Lautenschlager I, Jahnukainen T, Kardas P, Lohi J, Auvinen E, et al. A case of primary JC polyomavirus infection-associated nephropathy. Am J Transplant. 2014; 14: 2887-92.
- Leung AYH, Seun CKM, Lie AKW, Liang RHS, Yuen KY, Kwong YL. Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. Blood 2001; 98:1971–1978.
- Luo C, Bueno M, Kant J, Randhawa P. Biologic diversity of polyomavirus BK genomic sequences: Implications for molecular diagnostic laboratories. J Med Virol 2008; 80:1850–1857.
- Luo C, Hirsch HH, Kant J, Randhawa P. VP-1 quasispecies in human infection with polyomavirus BK. J Med Virol 2012; 84:152–61.
- Madhavan HN, Bagyalakshmi R, Revathy M, Aarthi P, Malathi, J. Optimisation and analysis of polymerase chain reaction based DNA sequencing for genotyping polyoma virus in renal transplant patients: a report from South India. Indian J Med Microbiol 2015; 33: 37–42.

- Marinic K, Sinchi J, Gómez M, Díaz R, Grillo S, Habegger-de Sorrentino A. Monitoring of BK virus in transplant patients of the renal unit of the Perrando Hospital, Chaco, Argentina. Nefrologia 2014; 34(6):799-800.
- Martínez MJ, Moreno C, Levican J, Peña M, Gaggero A, Chnaiderman J. Detección de polyomavirus BK y JC en extractos leucocitarios de sangre periférica de pacientes con infección por VIH del área norte de Santiago. Rev chil infectol 2016; 33(3): 298-302.
- Mateen FJ, Muralidharan R, Carone M, van de Beek D, Harrison DM, Aksamit AJ, Gould MS, Clifford DB, Nath A. Progressive multifocal leukoencephalopathy in transplant recipients. Ann Neurol 2011; 70(2):305-22.
- Matsuda Y, Qazi Y, Iwaki Y. A rapid and efficient method BK polyomavirus genotyping by high-resolution melting analysis. J Med Virol 2011; 83(12): 2128–2134.
- Mengelle C, Kamar N, Mansuy JM. JC virus DNA in the peripheral blood of renal transplant patients: a 1-year prospective follow-up in France. J Med Virol 2011; 83: 132–136.
- Moal V, Zandotti C, Colson P. Emerging viral diseases in kidney transplant recipients. Rev Med Virol 2013; 23(1):50-69.
- Nali LHS, Centrone CC, Urbano PRP, Penalva de Oliverira AC, Vidal JE, Miranda EP, Pannutti CS, Fink MCDS. High prevalence of the simultaneous excretion of polyomaviruses JC and BK in the urine of HIV-infected patients without neurological symptoms in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2012; 54(4): 201-5.
- Nukuzuma S, Takasaka T, Zheng HY, et al. Subtype I BK polyomavirus strains grow more efficiently in human renal epithelial cells than subtype IV strains. J Gen Virol 2006; 87:1893–901.
- Ouwens JP, Haaxma-Reiche H, Verschuuren EA, Timens W, Steenhuis LH, de Boer WJ, van der Bij W; Groningen Lung Transplant Group. Visual symptoms after lung transplantation: a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. Transpl Infect Dis 2000; 2(1):29-32.
- Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 1998; 14(9):817-8.
- Ramos E, Drachenberg CB, Wali R, Hirsch HH. The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs. Transplantation 2009; 87: 621–630.
- Randhawa P, Baksh F, Aoki N, Tschirhart D, Finkelstein S. JC virus infection in allograft kidneys: analysis by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. Transplantation 2001; 71 (9): 1300–03.
- Sanabria DJ, Mojsiejczuk LN, Torres C, Meyer AG, Mbayed VA, Liotta DJ, Campos RH, Schurr TG, Badano I. Genetic diversity of the JC polyomavirus (JCPyV) and mitochondrial DNA ancestry in Misiones, Argentina. Infect Gen Evol 2019; 75, 104011.
- Sauer R, Gölitz P, Jacobi J, Schwab S, Linker RA, Lee DH. Good outcome of brain stem progressive multifocal leukoencephalopathy in an immunosuppressed renal transplant patient: Importance of early detection and rapid immune reconstitution. J Neurol Sci 2017; 375:76-79.

- Schiavelli R, Bonaventura R, Rial MC, Petrone H, Pujol GS, Gaite LJ, Acosta M, Gutierrez A, Acosta F, Valdez G, Raffaele P, Chanta G, Perez M, Potes L, Suso E, Cremades G, Ibañez J, Imperiali N, Luxardo R, Castellanos M, Maggiora E, Carreño CA, Cobos M, Marinic K, Sinchi JL, Otero AB, Freire MC. First epidemiologic study in Argentina of the prevalence of BK viruria in kidney transplant patients. Transplant Proc 2014; 46(9):3010-4.
- Schold JD, Rehman S, Kayle LK, Magliocca J, Srinivas TR, Meier-Kriesche HU. Treatment for BK virus: incidence, risk factors and outcomes for kidney transplant recipients in the United States. Transpl Int 2009; 22(6):626-34.
- Shitrit D, Nirit L, Shiran SI, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a lung transplant recipient. J Heart Lung Transplant 2003; 22:946–950.
- Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, Lehtinen M, Dillner J. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. J Gen Virol 2003; 84:1499-504.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0. Mol Biol Evol 2007; 24:1596-9.
- Toan PQ, Bao Quyen LT, Thu Hang DT, My Anh TT, Cuong LM, Lanh NS, Su HX. Identification of BK Virus Genotypes in Recipients of Renal Transplant in Vietnam. Transplant Proc 2019; 51(8):2683-2688.
- Torres C, Barrios ME, Cammarata RV, Cisterna DM, Estrada T, Martini Novas S, Cahn P, Blanco Fernández MD, Mbayed VA. High diversity of human polyomaviruses in environmental and clinical samples in Argentina: Detection of JC, BK, Merkel-cell, Malawi, and human 6 and 7 polyomaviruses. Sci Total Environ 2016; 542:192-202.
- Tremolada S, Akan S, Otte J, Khalili K, Ferrante P, Chaudhury PR, Woodle ES, Trofe-Clark J, White MK, Jennifer Gordon J. Rare subtypes of BK virus are viable and frequently detected in renal transplant recipients with BK virus-associated nephropathy. Virology 2010; 404(2): 312-318.
- Varella RB, Zalona ACJ, Diaz NC, et al. BK polyomavirus genotypes Ia and Ib1 exhibit different biological properties in renal transplant recipients. Virus Res 2018; 243:65–8.
- Waggoner J, Martinu T, Palmer SM. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Following Heightened Immunosuppression after Lung Transplant: A Case Report. J Heart Lung Transplant 2009; 28(4): 395–398.
- Wen MC, Wang CL, Wang M, Cheng CH, Wu MJ, et al. Association of JC virus with tubulointerstitial nephritis in a renal allograft recipient. J Med Virol 2004; 72: 675-8.
- White MK, Khalili K. Expression of JC virus regulatory proteins in human cancer: potential mechanisms for tumourigenesis. Eur J Cancer 2005; 41(16):2537-48.
- Wong SY, Chan K-H, Cheng VCC, Yuen K-Y, Kwong Y-L, Leung AYH. Relationship of pretransplantation polyoma BK virus serologic findings and BK viral reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis 2007; 44:830–837.
- Wunderink HF, De Brouwer CS, Gard L, De Fijter JW, Kroes ACM, Rotmans JI, Feltkamp MCW. Source and Relevance of the BK Polyomavirus Genotype for Infection After Kidney Transplantation. Open Forum Infect Dis 2019; 6(3):ofz078.

- Yogo Y, Sugimoto C, Zhong S, Homma Y. Evolution of the BK polyomavirus: epidemiological, anthropological and clinical implications. Rev Med Virol 2009; 19:185–99.
- Zheng HY, Nishimoto Y, Chen Q, et al. Relationships between BK virus lineages and human populations. Microbes Infect 2007; 9:204–13.
- Zhong S, Randhawa PS, Ikegaya H, Chen Q, Zheng HY, Suzuki M, et al. Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. J Gen Virol 2009; 90:144e52.

ABSTRACT

In a retrospective study we investigated the prevalence of polyomaviruses (JCV and BKV) in blood of transplant patients of Cordoba. A total of 68 plasma samples (2016-2017 years) were studied. After DNA extraction, PCR assay was used to amplify a sequence of 173 bp of the polyomavirus`s T antigen, followed by analysis using the BamHI restriction endonuclease. Infection by polyomavirus was detected in 25% (17/68) of the subjects, average age 21.9 years (1-63 years). Also, PCR for JCV and BKV was performed using primers complementary to VP1 gen of each virus. While the vast majority of infections (13.2%; 9/68) were caused by BKV a high rate of JCV 11.7% (8/68) was also found among transplant recipients. We amplified VP1 in 76.5% (13/17) of the T antigen polyomavirus positive samples and showed that all belonged to 2A JCV genotype (10/13) or Ia subtype BKV (3/13).

This is the first report of polyomaviruses (JCV and BKV) infection in transplant recipients from Cordoba Argentina and molecular characterization of them. Our study evidenced the need to screen for both polyomaviruses in transplant recipients. The routine use of PCR on plasma seems to be a useful tool for the rapid and sensitive detection of reactivated polyomavirus in transplanted recipients.

EVALUACIÓN DE MECANISMOS INMUNOLÓGICOS ASOCIADOS AL RECHAZO DEL TRASPLANTE INTESTINAL. ROL DE LOS LINFOCITOS T REGULATORIOS E INFLUENCIA DEL RÉGIMEN DE INMUNOSUPRESIÓN

María Virginia Gentilini [1], Constanza Arriola Benítez [1], Andrés Machicote [2], Luis Pérez Illidge [1], Araceli Castro [3], María Florencia Fernández [3], Claudia Fuxman [3], Diego Ramisch [3], Carolina Rumbo [3], Martín Rumbo [4], Leonardo Fainboim [5], Gabriel Gondolesi [1,3]

[1] Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería. IMETTyB - CONICET - Universidad Favaloro. [2] Hamburg Center for Translational Immunology, University Medical Center Hamburg, Germany. [3] Hospital Universitario Hospital Favaloro. [4] Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatalógicos. IIFP - CONICET - Universidad Nacional de La Plata. [5] Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo. INIGEM - CONICET

INTRODUCCIÓN

El rechazo del Trasplante Intestinal (TxI) representa una de las principales causas de morbimortalidad en pacientes con trasplante de órganos sólidos. Durante este proceso se activan múltiples mecanismos inflamatorios, los cuales inician una cascada de eventos que culmina con la liberación de moléculas efectoras incrementando la muerte celular[1,2]. Si dichos eventos no son resueltos en tiempo y forma pueden generar cuadros de sepsis grave o falla multiorgánica por translocación de productos microbianos que ponen en riesgo la vida del paciente. Si bien las terapias de inmunosupresión intentan prevenir el rechazo del injerto, dan lugar a serias complicaciones tales como infecciones crónicas, falla de órganos, etc. La morbimortalidad alta y la pérdida de eficacia progresiva asociada a los inmunosupresores continúan siendo un problema serio[3,4]. Por lo tanto, resulta necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que favorezcan la inducción de tolerancia inmunológica periférica permitiendo así la aceptación del injerto, reduciendo o evitando la inmunosupresión farmacológica de manera de asegurar la sobrevida del injerto y del paciente a largo tiempo y evitar los efectos adversos relacionados[5,6] .

Los linfocitos T reguladores (Tregs) y sus productos son los actores principales en la inducción de tolerancia para la prevención de rechazo de injertos, su inducción tanto in vivo como su expansión ex vivo y posterior transferencia representa una de las promesas terapéuticas más relevantes[7–9]. En la práctica clínica, los pacientes con TxI reciben terapias inmunosupresoras que combinan tacrolimus con esteroides, y según el caso, se puede incluir una tercera droga inmunosupresora. Dichas drogas ejercen efectos sobre los Tregs, así como también sobre los linfocitos efectores. Mientras la inmunosupresión con rapamicina (inhibidor de mTOR) beneficia la sobrevida de los Tregs, el uso de inhibidores de calcineurina la perjudica. Estos últimos, actúan reduciendo la expresión y producción de IL-2[10], citoquina clave para mantener la estabilidad del linaje de las Tregs. Por su parte, la expansión de células T efectoras es dependiente de la activación de la vía PI-3-

kinasa/AkT/mTOR. Considerando lo expuesto, el objetivo general del trabajo **es evaluar los mecanismos inmunológicos asociados al rechazo intestinal,** focalizando el interés en el rol de los Tregs durante este proceso y la influencia del régimen de inmunosupresión. Este estudio permitirá determinar si hay una correlación entre la performance clínica, la frecuencia de Tregs en el injerto y el tipo de inmunosupresión, aportando información valiosa al momento de definir el tratamiento inmunosupresor a aplicar, y sentando precedentes para la utilización de Tregs o su inducción in vivo como potencial herramienta terapéutica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cohorte de estudio.

Para abordar nuestro objetivo trabajamos con la siguiente cohorte de pacientes: a) Trasplantados con y sin rechazo, se obtuvieron biopsias y muestras de explantes de intestino delgado distal. Las biopsias con rechazo fueron incluidos previamente al tratamiento con inmunosupresión aumentada; b) Controles sanos, se utilizaron biopsias de pacientes no trasplantados sometidos a estudios de control por chequeos de rutina por cuadros de dolor abdominal, constipación y pólipos por antecedentes con cáncer, estudio celiaquía. El presente proyecto, así como los formularios de consentimiento informado del paciente han sido presentados y aprobados por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Universitario Fundación Favaloro (HUFF, DDI (1477) 1119).

Obtención de muestras.

Se obtuvieron muestras de tejido intestinal a partir de las biopsias endoscópicas y explantes intestinales. A partir de estas muestras se aislaron células de la lámina propria para determinar la frecuencia de Tregs (CD4+CD25+Foxp3+y CD8+HLA-DR+) mediante citometría de flujo; una parte se destinó al análisis histopatológico a cargo del Servicio de Patología del HUFF y otra parte fue almacenada en RNALater para evitar la degradación y conservadas a -80°C hasta su procesamiento para el estudio de expresión génica.

Citometría de flujo.

Linfocitos T regulatorios CD4+CD25+Foxp3+. Para evaluar la frecuencia de Treg mediante citometría de flujo, se analizó la expresión intracelular de FOXP3 en células T CD3+ CD4+ y CD25+; - Linfocitos T regulatorios CD8+ HLA-DR+. La identificación de esta población se realizó mediante la evaluación de la expresión de los marcadores de superficie CD3, CD4, CD8, HLA-DR mediante citometría de flujo (FacsAria II, BD).

Análisis de expresión génica.

Dada la plasticidad de las células al encontrarse con un ambiente inflamatorio o regulatorio fue de interés determinar el perfil inmune del intestino durante el rechazo intestinal. Para tal fin, a partir de las biopsias o fragmentos de piezas quirúrgicas se obtuvo el RNA total utilizando columnas comerciales (ZymoReasearch) y se realizó la transcripción reversa (M-MLV, Invitrogen) empleando random primers y 1µg de ARN total. Por qPCR se determinó la expresión de IL-2, IL-10, TGF-β, INF-γ, IL-6, TNF- α, etc. utilizando FastStart Universal syber green Master Mix (Sigma). Como gen de referencia se utilizó GAPDH.

Inmunohistoquímica.

Para el diagnóstico histopatológico, las biopsias y explantes fueron fijadas en formol, deshidratadas y posteriormente incluidas en bloques de parafina. Estos mismos bloques fueron utilizados para el presente protocolo de investigación. Se determinó la frecuencia de poblaciones de células inmunes mediante tinción con anticuerpos específicos anti-CD3, -CD4, -CD8, -Foxp3, -LB, -Ki-67 por inmunohistoquímica siguiendo los protocolos ya descriptos por nuestro laboratorio.

Evaluación histopatológica.

Las características histopatológicas de las muestras clínicas, así como también el diagnóstico de rechazo o no y su grado de severidad fue realizado por el Servicio de Patología del Hospital Universitario Fundación Favaloro.

Estadística.

Se realizaron multiples test, Mann Whitney test, Kruskal-Wallis con post-test de Dunn. Utilizando el software GraphPad, $p<0.05$ se consideró significativo.

En la **figura 1** se ilustra la cohorte de estudio y la metodología aplicada.

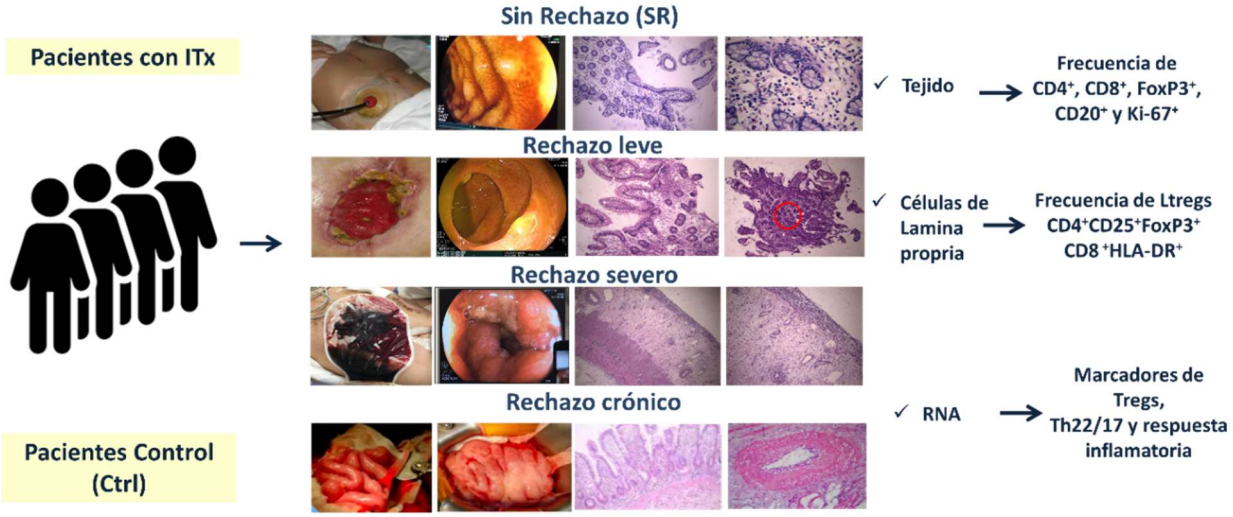


Figura 1. Pacientes y métodos. En las fotos se muestra la visión endoscópica del injerto y análisis histopatológico de biopsias de íleon (H&E) en el seguimiento de los pacientes, biopsias incorporadas al estudio. El análisis y diagnóstico histopatológico de cada muestra es realizado por los patólogos del servicio de Patología (HUFF).

RESULTADOS

La frecuencia de células FOXP3 en mucosas es reducida durante el rechazo en el TXI.

A partir del análisis de estudios inmunohistoquímicos observamos una marcada reducción de las células Foxp3+ en aquellos pacientes que sufren rechazo intestinal en comparación con aquellos que son tolerantes con el injerto. A su vez, observamos que la frecuencia de células CD4 fue similar en ambos grupos. Tal como se esperaba la población CD8+ se encontró significativamente incrementada en pacientes con rechazo del injerto, como así también la frecuencia de células CD20+ ($p<0.05$). En la figura 2A podemos observar fotografías (40x) de los cortes de los tacos histológicos de pacientes sin rechazo (SR) y con rechazo (RX), debajo de cada panel se observa el correspondiente recuento celular. Cada punto corresponde a una muestra y cada color corresponde a la medicación que el paciente recibió al momento de toma de muestra. En el punto B se describen las características de cada paciente y en el punto C se describen las características del tipo de rechazo de cada paciente y el porcentaje de inmunosupresión de nuestra cohorte de estudio.

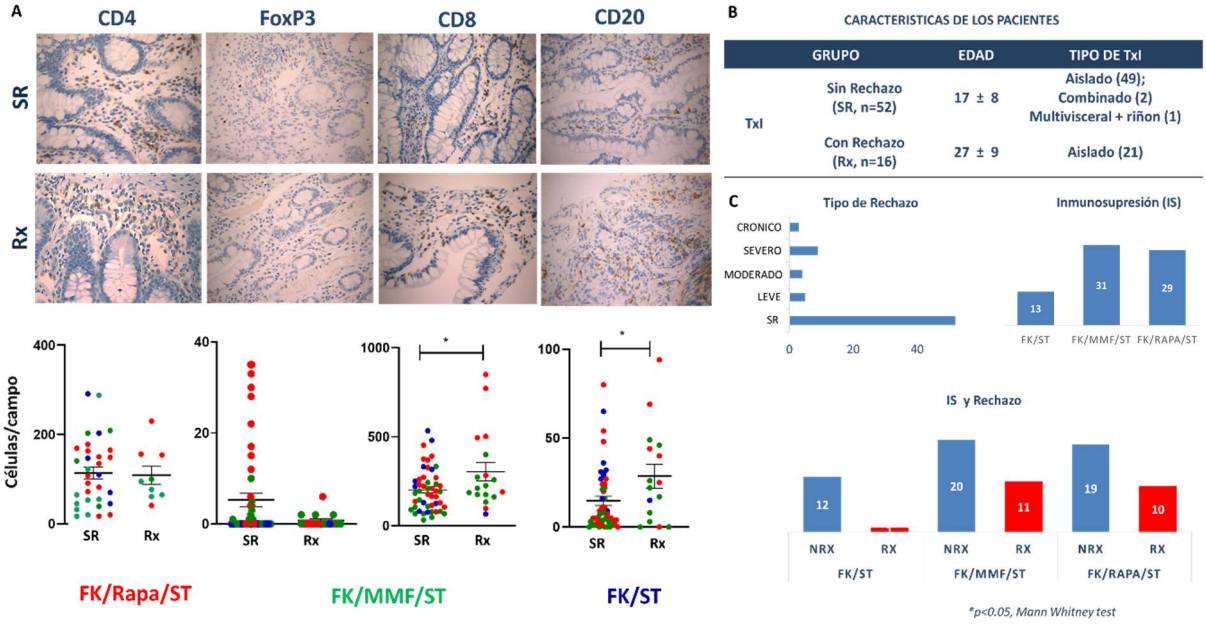
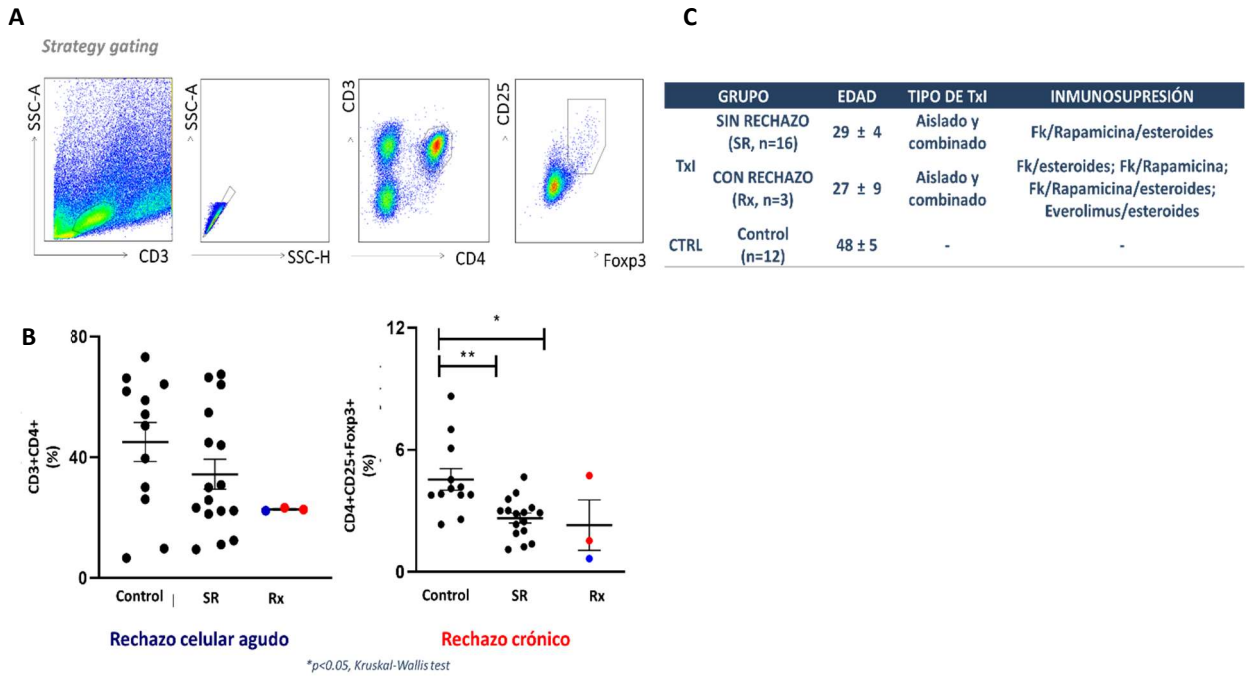


Figura 2. Reducción de la expresión de células Foxp3+ durante el rechazo intestinal.

Células CD4+ regulatorias intestinales son reducidas en pacientes con rechazo intestinal.

En línea con los resultados descriptos anteriormente, el porcentaje total de las células CD4+CD25+FOXP3+ evidenciada mediante citometría de flujo, se encontró significativamente disminuida en el injerto intestinal de los pacientes con rechazo en comparación con el grupo control ($p<0.05$), Fig.3.



C

	GRUPO	EDAD	TIPO DE TxI	INMUNOSUPRESIÓN
TxI	SIN RECHAZO (SR, n=16)	29 ± 4	Aislado y combinado	Fk/Rapamicina/esteroides
	CON RECHAZO (Rx, n=3)	27 ± 9	Aislado y combinado	Fk/esteroides; Fk/Rapamicina; Fk/Rapamicina/esteroides; Everolimus/esteroides
CTRL	Control (n=12)	48 ± 5	-	-

Figura 3. Células Tregs se encuentran disminuídas en el tejido intestinal durante el rechazo de injerto. **A.** Estrategia de identificación de linfocitos CD4+CD25+ Foxp3+ en íleon de pacientes con TxI con rechazo (Rx) y sin rechazo (SR) vs. individuos sanos (control) mediante citometría de flujo. **B.** Frecuencia de células CD3+ CD4+ y CD4+ CD25+ Foxp3+ en íleon, en colores se identifica el tipo de rechazo diagnosticado. **C.** Características de la cohorte de pacientes incluida en el estudio.

Células CD8+ regulatorias intestinales.

Recientemente se ha demostrado que las células humanas intestinales $CD8^{+}HLA\text{-}DR^{+}$ son regulatorias[11]. Dado que nada se ha reportado de esta población celular en el contexto de TxI nos propusimos caracterizar dicha población en nuestra cohorte de pacientes mediante citometría de flujo. Los resultados indican que esta población se encuentra significativamente aumentada en los pacientes sin rechazo y que disminuyen durante los eventos de rechazo ($p<0.05$, Figura 4). Considerando que esta población CD8 expresa alta frecuencia de CCR5 y su actividad supresora la ejercen via el eje PD-1/PD-L1, evaluamos la expresión de estas moléculas en la lámina propria de nuestros pacientes (Fig. 4C). Los resultados preliminares muestran que hay una tendencia a la reducción de esta subpoblación celular en los pacientes tolerantes. Sin embargo, más estudios debemos realizar para arribar a una conclusión.

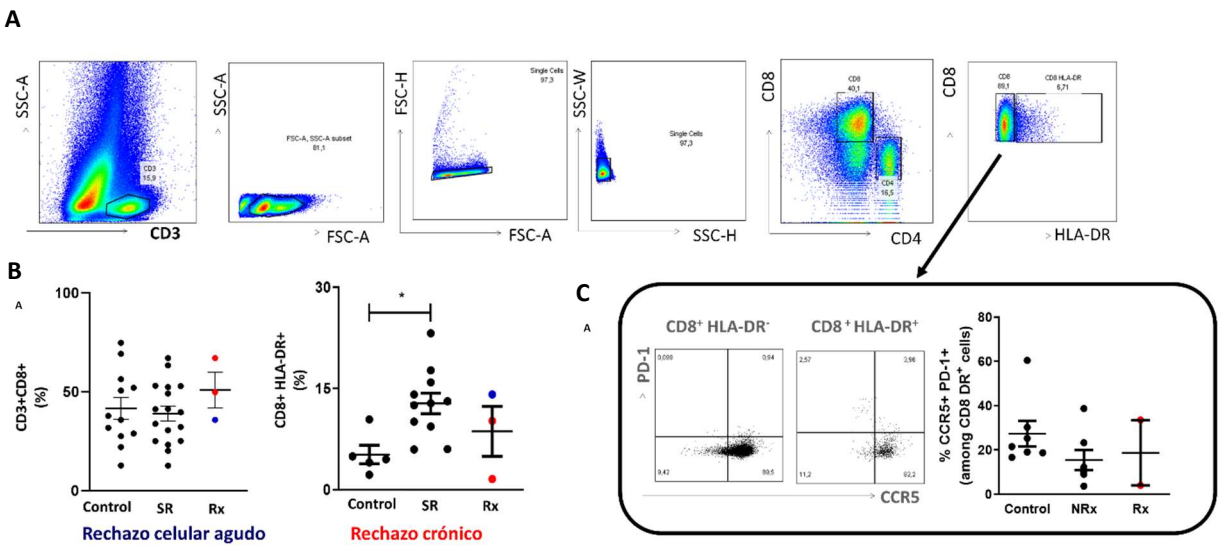


Figura 4. La frecuencia de células Tregs CD8+ HLA-DR+ se encuentran incrementadas en el tejido intestinal de los pacientes trasplantados tolerantes. **A.** Estrategia de identificación de linfocitos CD8+HLA-DR+ en íleon de pacientes con TxI con rechazo (Rx) y sin rechazo (SR) vs. individuos sanos (control) mediante citometría de flujo. **B.** Frecuencia de células CD3+ CD8+ y CD8+HLA-DR+ en íleon, en colores se identifica el tipo de rechazo diagnosticado. **C.** Frecuencia de la subpoblación que expresa CCR5 y PD-1.

Desbalance hacia un perfil inflamatorio durante el proceso de rechazo intestinal.

Finalmente, al evaluar la expresión de RNA mensajero de genes involucrados en el perfil inflamatorio, regulatorio y marcadores de perfil Th17/Treg en la mucosa intestinal mediante qRT-PCR, observamos nuevamente una reducción en la expresión relativa de Foxp3, acompañado por una tendencia a la reducción en el radio IL-10/IL-17, y un incremento la relación RORγ/Foxp3 entre ambos grupos. Además, la expresión de IL-1 e IL-6 fue significativamente mayor en aquellos pacientes trasplantados con rechazo que en los tolerantes **(Fig. 5).**

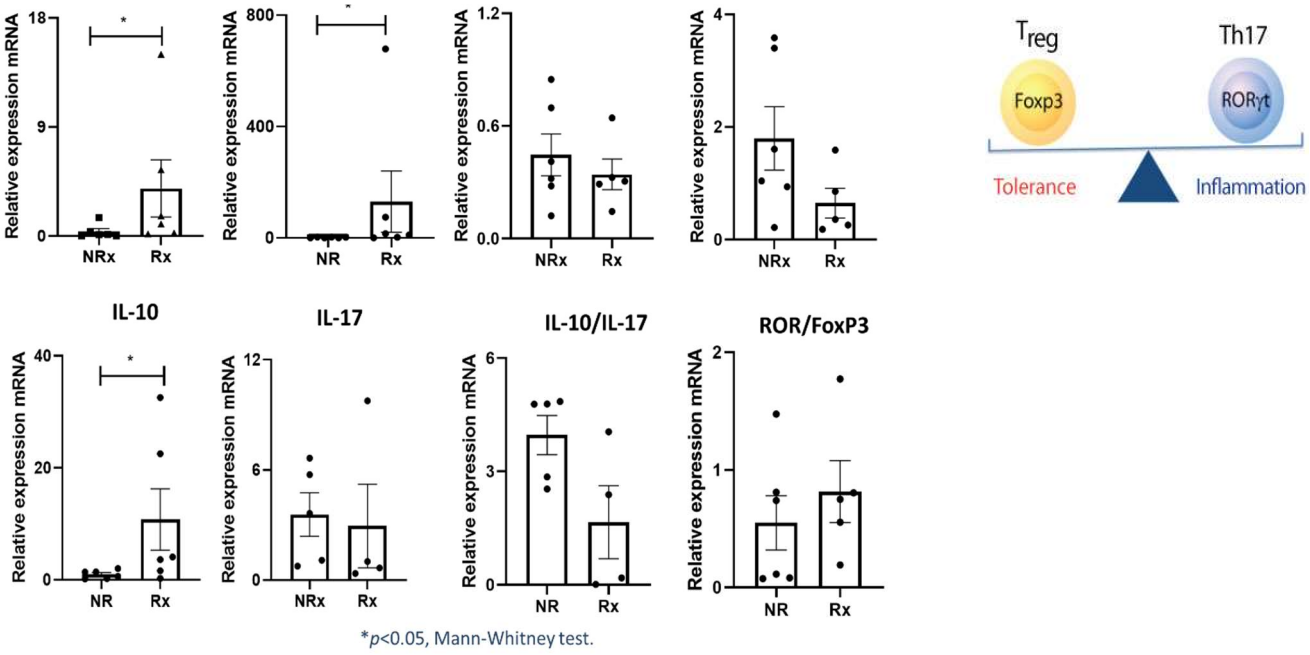


Figura 5. Expresión génica en intestino de pacientes con rechazo intestinal vs. tolerantes. Expresión relativa de genes con perfil regulatorio, inflamatorio en tejido intestinal de pacientes trasplantados con y sin rechazo, mediante qRT-PCR y cálculo del ΔΔCT.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que durante el rechazo intestinal hay un desbalance inmunológico polarizado al estado inmune inflamatorio con disminución de las células T reguladoras. Terapias que sean dirigidas a expandir dicha población podrían potencialmente ser usadas como una estrategia para prevenir el rechazo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gallucci, S. & Matzinger, P. Current Opinion in Immunology (2001) doi:10.1016/S0952-7915(00)00191-6.
2. Herbert, D. R. et al. J. Exp. Med. 206, 2947–2957 (2009).
3. Bharadwaj, S. et al. Gastroenterology Report (2017) doi:10.1093/gastro/gow045.
4. Abu-Elmagd, K. M. et al. Transplant International (2009) doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00785.x
5. Meier, D., Rumbo, M. & Gondolesi, G. E. International Reviews of Immunology (2014) doi:10.3109/08830185.2013.829468.
6. Dai, H., et al. Frontiers in Immunology (2020) doi:10.3389/fimmu.2020.01044.
7. Zeng, S. et al. Transplant Immunology (2020) doi:10.1016/j.trim.2019.101250.
8. Ceulemans, L. J. et al. Am. J. Transplant. (2016) doi:10.1111/ajt.13815.
9. Atif, M., et al. Clinical and Translational Immunology (2020) doi:10.1002/cti2.1099.
10. Furukawa, A., Wisel, S. A. & Tang, Q. Transplantation (2016) doi:10.1097/TP.0000000000001379.
11. Machicote A, et al. Front Immunol (2018). doi: 10.3389/fimmu.2018.02788. eCollection 2018.

RESUMEN

El rechazo celular agudo (RCA) es la mayor causa de pérdida de injerto y morbilidad en el Trasplante Intestinal (TxI). Dado que las células T regulatorias demostraron ser cruciales en la prevención de rechazo en otros órganos sólidos trasplantados, nuestro objetivo fue evaluar el rol de las células CD4 y CD8 regulatorias y el estado inmunológico durante el RCA en el aloinjerto intestinal.

Para tal fin, células de lámina propria provenientes de biopsias y explantes intestinales fueron aisladas de pacientes con TxI [Sin Rechazo, SR=16; con Rechazo, Rx=3] y en pacientes no trasplantados [controles=12]. Se determinó la frecuencia de células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ y $CD8^+HLD\text{-}DR^+$; la expresión de CCR5 and PD-1 dentro de $CD8^+HLD\text{-}DR^+$ mediante citometría de flujo; los niveles de expresión de Foxp3, TGF-β, IL-10, RORγ, IL-22, IL-17A, IL-1, IL-6 en biopsias [SR=6; Rx=4; Control=8] por qPCR; y la frecuencia de $CD4^+$, $CD8^+$, $FoxP3^+$, $CD20^+$ y Ki-67^+ mediante inmunohistoquímica [SR=40; Rx= 16].

El porcentaje de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ fue menor en el injerto de los pacientes con rechazo vs. control. La frecuencia de células Foxp3+ en los cortes histológicos durante el RCA fue menor que en los pacientes SR. La expresión génica $Foxp3^+$ mostró el mismo perfil, y fue acompañado por una reducción en la relación IL-10/IL-17. La relación RORγ/Foxp3 mostró similar expresión entre los grupos. Las células $CD8^+$ se encontraron incrementadas durante el RCA, detectándose una reducción en las células $CD8^+$HLD-DR^+. La frecuencia de las células CCR5+PD-1+CD8+ fue menor en pacientes con TxI *vs.* control. La expresión génica de IL-1 e IL-6 fue significativamente mayor durante el RCA. Nuestros resultados indican que durante el rechazo en el TxI existe un desequilibrio entre el estado inmune regulador e inflamatorio en el aloinjerto. Las terapias dirigidas a ampliar la población de Tregs pueden utilizarse potencialmente como un enfoque para prevenir la ACR.

ABSTRACT

Acute cellular rejection (ACR) is a major cause of graft loss and morbitidy in intestinal transplant (ITx) patients. Regulatory T (T regs) cells have been shown to play a pivotal role in the prevention of rejection in other solid organ transplants. Our aim was to evaluate the immunological status during the ACR focusing on the study of CD4 and CD8 Tregs.

Thus, lamina propria cells of ileum biopsies and explants were isolated from ITx [Non-rejection (NR)=16; Rejection (Rx)= 3] and non-transplant patients [NITx=12]. $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ and $CD8^+$HLD-DR^+ cells and the expression of CCR5 and PD-1 molecules among these populations were determined by flow cytometry. Total levels of functional markers of Tregs (Foxp3, TGF-β, IL-10), Th22/17 (RORγ, IL-22, IL-17A), and inflammatory response (IL-1, IL-6) in biopsies [NR=6; Rejection (Rx)=4; NITx=8] were measured by qPCR. $CD4^+$, $CD8^+$, $FoxP3^+$, $CD20^+$ and Ki-67^+ cells were detected by immunohistochemical staining [NR=40; Rx= 16].

Total percentage of Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ were decreased in the graft of the ITx patients during the ACR in comparison with NITx patients. Although, non-statistically significant changes in $Foxp3^+$ cells were observed, mucosal $Foxp3^+$ mRNA expression was diminished accompanied by a tendency to the reduction of the ratio IL-10/IL-17. RORγ/Foxp3 ratio did not show a different expression between groups. $CD8^+$ cells were increased during the ACR, but a reduction of regulatory $CD8^+$HLD-DR^+ cells frequency was observed. Remarkably, CCR5+ PD-1+ CD8 T regs cells were reduced in the ITx patient in comparison to NITx. This reduction increased during the rejection process. Significant relative expression of IL-1 and IL-6 mRNA demonstrated a proinflammatory immune status during the rejection.

Our results indicate that ITx rejection is driven by a disbalance between regulatory and inflammatory immune status in the allograft. Therapies directed to expand Tregs population can potentially be used as an approach to prevent ACR.

SIGNIFICANCIA PRONÓSTICA DE RANK EN FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL TUMOR EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA TEMPRANO

María Belén Giorello, Francisco Raúl Borzone, María Florencia Mora, María del Rosario Padín, Alejandra Wernicke, Vivian Labovsky, Norma Alejandra Chasseing

Instituto de Biología y Medicina Experimental - IBYME

INTRODUCCIÓN

El tumor de mama es un sistema complejo compuesto por células tumorales y su microambiente estromal, donde los fibroblastos asociados al tumor (CAFs) desempeñan un papel importante [1, 2]. Se ha observado que las células madre mesenquimales (MSCs) de la médula ósea (MO) pueden migrar hacia el tumor primario de mama en las etapas tempranas de la enfermedad y contribuir al desarrollo tumoral, ya sea como tal o diferenciándose a CAFs [3–5]. Estas células MSCs/CAFs interactúan con las células tumorales, proporcionando señales que promueven la agresividad del tumor. Especialmente en lo que respecta a la progresión y metástasis del cáncer de mama, los receptores de quimioquinas y sus ligandos parecen tener un gran impacto en una gran cantidad de vías celulares que afectan el resultado final [6, 7]. Al respecto, un sistema que podría estar involucrado en esta intrincada comunicación es el RANK/RANKL. Se sabe que este sistema molecular es clave en la regulación del metabolismo y la remodelación ósea [8]. Pero además, se ha demostrado que está implicado en la progresión del cáncer de mama y el desarrollo de metástasis [8–10]. Estudios previos han destacado el efecto proliferativo inducido por la interacción entre RANKL y RANK en las células epiteliales mamarias, lo que sugiere una participación en el inicio y progresión del cáncer de mama [11–16]. Investigaciones anteriores de nuestro laboratorio han demostrado la expresión de RANK y RANKL tanto en las células tumorales mamarias como en las células estromales fusiformes CD34 (-), no asociadas a la vasculatura en tumores primarios de pacientes con cáncer de mama (PCM) temprano [7]. Se ha encontrado una asociación entre la expresión de RANKL, tanto de origen epitelial tumoral como de las células estromales fusiformes (*fibroblast-like*), y la expresión de RANK en estas células estromales, lo que sugiere una comunicación recíproca entre ambos tipos celulares y una regulación autócrina y parácrina de RANK. Por otro lado, investigaciones previas han revelado que las MSCs de la MO deficientes en RANKL presentan una deficiente diferenciación osteogénica y autorrenovación[17, 18]. Además, se ha observado que la sobreexpresión de RANK aumenta la degradación de β-catenina e inhibe su síntesis, lo cual tiene implicaciones en la diferenciación osteogénica de las MSCs [18]. Cabe mencionar que el RANKL se sintetiza tanto en forma unida a la membrana como en forma soluble, y ambas formas desempeñan diferentes funciones fisiológicas, especialmente en la osteoclastogénesis y el desarrollo del sistema inmunitario [19–21]. Por otro lado, otros estudios, han demostrado que RANK se expresa en células tumorales de osteosarcoma y está asociado con la migración de osteoblastos al interior del hueso, lo cual es relevante

en la regulación de la osteoclastogénesis y la resorción ósea [22, 23]. A pesar de los avances en la comprensión del sistema RANKL-RANK, aún se conoce poco y existe cierta contradicción en cuanto a su acción en los CAFs y MSCs de MO del microambiente tumoral del tumor primario, particularmente en el cáncer de mama. Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados en el tema y considerando que los parámetros pronósticos clásicos no siempre son predictivos de manera precisa en PCM, es crucial evaluar su potencial como biomarcador pronóstico en pacientes en etapas tempranas de la enfermedad. Asimismo, resulta importante estudiar la importancia de RANK en los procesos de autorrenovación, proliferación y migración de los CAFs. En este estudio, hemos demostrado que la alta expresión de RANK en las células estromales fusiformes CD34(-), no asociadas a la vasculatura, se asocia de manera significativa con un riesgo elevado de metástasis, un menor tiempo libre de metástasis y menor sobrevida. Eventos todos que indican un peor pronóstico en pacientes con carcinoma ductal infiltrante en estadios I y II. Además, hemos identificado una co-expresión de RANK con el marcador CD105, ampliamente reconocido como un marcador MSCs. Por último, nuestros hallazgos funcionales indican que el receptor RANK desempeña un papel importante en la migración de estas células estromales en el microambiente tumoral mamario. En resumen, nuestros resultados respaldan la relevancia clínica de la expresión de RANK en estas células estromales (*fibroblast- like*) y sugieren su potencial como objetivo terapéutico en el manejo del carcinoma ductal infiltrante en estadios tempranos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis retrospectivo.

Selección y caracterización de pacientes con cáncer de mama.

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo que incluyó a 155 pacientes consecutivas sometidas a tratamiento quirúrgico por cáncer de mama en el Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina. Estas pacientes tenían un diagnóstico histológico confirmado de carcinoma ductal infiltrante en estadio temprano (etapa I/II) basado en el sistema de clasificación TNM de la Unión Internacional Contra el Cáncer [24]. Se garantizó un período de seguimiento mínimo de 10 años después de la cirugía. Se excluyeron las PCM que recibieron terapias neoadyuvantes, aquellas sin muestras de tejido suficiente y aquellas con tumores primarios anteriores. Después de la cirugía, todas las pacientes recibieron el tratamiento adecuado, que incluyó terapia hormonal, radioterapia y/o quimioterapia. El plan de tratamiento se determinó según las características clínicas e histopatológicas de cada paciente y las pautas recomendadas por la Sociedad Europea de Oncología Médica [25, 26]. Este estudio fue aprobado por los Comités de Ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) y el Hospital Italiano. Se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes o sus familiares (aprobación de IBYME: CE 050 y aprobación del Hospital Italiano: n.º 5009). La investigación se llevó a cabo de acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki. Para proteger la privacidad de las pacientes, los registros médicos se anonimizaron mediante un código numérico.

Las características clínicas de las pacientes, consideradas marcadores pronósticos clásicos, se categorizaron según los valores de corte especificados en los protocolos del Hospital Italiano [27]. Estas características incluyeron: a) Edad (<50 o ≥50 años), b) Tamaño del tumor (≤2 o >2 cm), c) Grado histológico según el sistema de gradación

Scarff-Bloom-Richardson [28], categorizado como diferenciado (G1), intermedio (G2) o pobre (G3), d) Expresión de los receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y estado HER2/neu, clasificados como negativos o positivos según Wernicke M et al. [27], y e) Presencia de ganglios linfáticos metastásicos regionales, registrada como negativa (sin participación en la disección axilar o ganglio linfático centinela) o positiva (incluyendo micro-metástasis). Los datos de resultados incluyeron la recidiva local, la aparición de metástasis, la aparición de metástasis óseas, la aparición de metástasis viscerales, la aparición de metástasis mixtas (óseas y viscerales), tiempo libre de recidiva local (RFS), tiempo libre de metástasis (MFS), tiempo libre de metástasis óseas (BMFS), tiempo libre de metástasis viscerales (VMFS), tiempo libre de metástasis mixtas (mix-MFS) y la sobrevida global (OS). MFS, BMFS, VMFS y mix-MFS se definieron como el intervalo de tiempo desde la fecha de la cirugía hasta la primera observación de la aparición del tumor (evento metastásico y/o recurrencia local) o el último seguimiento. Las pacientes incluidas en el grupo de metástasis mixtas fueron aquellas que, en el momento del seguimiento, presentaron tanto metástasis óseas como viscerales, sin diferenciación de qué evento ocurrió primero. La OS se definió como el intervalo desde la fecha de la cirugía hasta la muerte o el último seguimiento [29]. La Tabla 1 proporciona información detallada sobre las características clínicas específicas de las pacientes y sus datos de resultados correspondientes. El sitio de metástasis del cáncer de mama se describe en la Tabla 2. Además, se documentaron datos sobre la presencia de un solo o múltiples focos de metástasis dentro del mismo órgano.

Características clínico-patológicas	Pacientes (n)	Pacientes (%)
Edad (años)		
<50	42	27,10
≥50	113	72,90
Tamaño tumoral		
≤2cm	111	71,61
>2 cm	44	28,39
RE		
Negativo	19	12,26
Positivo	136	87,74
RP		
Negativo	31	20,00
Positivo	124	80,00
Her2/neu		
Negativo	137	99,39
Positivo	18	11,61
Grado histológico		
G1	12	7,74
G2	89	57,42
G3	54	34,84

Ganglios linfáticos locoregionales		
Negativo	106	68.39
Positivo	49	31,61
Recidiva local		
Negativo	129	83,23
Positivo	26	16.,77
Ocurrencia metastásica		
Negativo	109	70,32
Positivo	46	29,68
Ocurrencia metastásica ósea		
Negativo	133	85,81
Positivo	22	14,19
Ocurrencia metastásica visceral		
Negativo	137	88,39
Positivo	18	11,61
Ocurrencia metastásica mixta		
Negativo	149	96,13
Positivo	6	3,87
Muerte		
Negativo	109	70,32
Positivo	46	29,68

Tabla 1. Detalles de las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de mama incluidas en el estudio (n=155). RE *receptor de estrógeno*; RP *receptor de progesterona.*

Sitio metastásico		**Pacientes (n)**	**Pacientes (%)**
Metástasis óseas	Arcos costales	4	13,70
	Vertebras	10	34,48
	Vertebras - cresta ilíaca - femur	5	17,24
	Femur	1	3,45
	Vertebras- calota	1	3,45
	Vertebras - arcos costales	1	3,45

Metástasis viscerales	Pulmón	6	15,00
	Pleura - ganglios supraclaviculares	1	2,50
	Hígado	6	15,00
	Pulmón - hígado - cerebro	2	5,00
	Cerebro	2	5,00
	Piel	1	2,50
Metástasis mixtas	Vertebras - esternón - pulmón	2	25,00
	Pulmón - hígado - vertebra	1	12,50
	Hígado - vertebras	2	25,00
	Pulmón - esternón	1	12,50

Tabla 2. Detalles de los sitios metastásicos incluidos en el estudio.

Análisis de la expresión de RANK

Las muestras de tejido mamario fueron procesadas siguiendo la metodología delineada por Labovsky et al. [7]. Con el fin de evaluar los niveles de expresión de RANK en las células estromales de morfología fusiforme, no asociadas a la vasculatura, empleamos un protocolo de inmunohistoquímica como se describe en trabajos anteriores [7]. La señal inmunohistoquímica se evaluó utilizando el sistema de puntuación Allred [30]. Las células fibroblásticas con tinción membranosa, tinción nuclear y morfología característica de forma fusiforme, no asociadas a la vasculatura, fueron contadas en el estroma intratumoral. A los porcentajes de células positivas se le asignaron puntuaciones de acuerdo a las siguientes categorías: 0 (<10%), 1 (10-30%), 2 (31-60%), 3 (61-90%) y 4 (>90%). La intensidad de tinción se puntuó en una escala de 0 (sin tinción), 1 (débil), 2 (moderada) y 3 (fuerte), basado en la intensidad relativa de la expresión de citoqueratina de bajo peso molecular AE1-AE3 [7]. La puntuación final de tinción, que varía de 0 a 7, se calculó combinando el porcentaje de células positivas y la puntuación de intensidad de tinción. La enumeración se realizó en cinco campos ópticos representativos por sección de tejido a una magnificación de 400x. La evaluación fue realizada de manera independiente por dos patólogos, con un acuerdo del 88,4% en la evaluación inmunohistoquímica entre los observadores (valor Kappa = 0,867) (Figura 1).

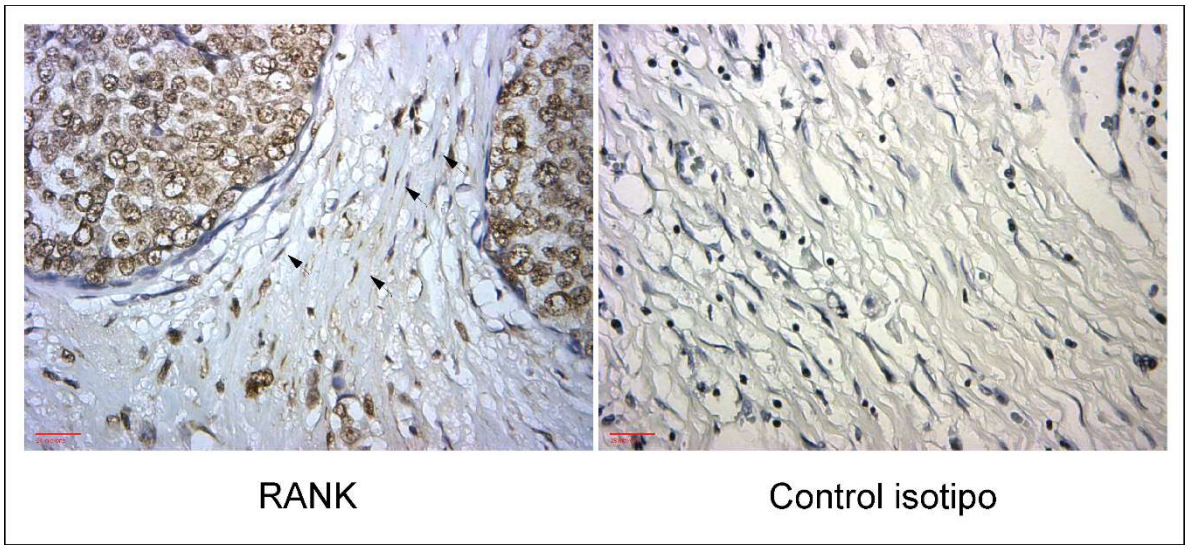


Figura 1. Expresión de RANK en CAFs del tumor primario de pacientes con cáncer de mama. Panel izquierdo: ejemplo representativo de la inmunomarcación de RANK (cromógeno marrón) en las células estromales evaluadas del tejido del tumor primario de una paciente con cáncer de mama. Panel derecho: control de isotipo. Los núcleos se tiñeron con hematoxilina (color púrpura). Ampliación original: ×400. Las barras de escala representan 25 μm.

Características estromales intra-tumorales.

Las características histológicas del estroma tumoral, como él % estroma intratumoral, la cantidad de fibroblastos, la deposición de colágeno, la infiltración linfocítica, los cambios mixoides y la vascularización sanguínea y linfática, se evaluaron mediante tinción de hematoxilina y eosina. El estroma intratumoral se evaluó como un porcentaje y se clasificó como bajo (<50%) o alto (≥50%) en cantidad. Los patólogos asignaron puntuaciones que iban desde ausente hasta abundante para indicar la presencia de fibroblastos, deposición de colágeno, infiltración linfocitaria, cambios mixoides y vascularización sanguínea y linfática. El grado de desmoplasia también se documentó en base a información obtenida de los registros médicos de las pacientes, categorizado como bajo/moderado o severo.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico de la expresión de RANK y su correlación con las características clínico-patológicas se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Labovsky et al. [7]. Para determinar el valor de corte óptimo para la expresión del receptor, utilizamos los valores del primer cuartil (Q1), mediana y tercer cuartil (Q3) para la clasificación de las muestras. Las asociaciones entre la expresión de RANK categorizada y la OS paciente se evaluaron mediante análisis univariable. Se seleccionó el valor de corte que proporcionara el valor p más bajo. Los valores de corte óptimos para la expresión del receptor fueron los siguientes: RANK = 1 (Mediana), cantidad de fibroblastos = 2 (Q1), deposición de colágeno = 1 (Q1), infiltración linfocítica = 1 (Q3), cambios mixoides = 0 (Q1), vascularización sanguínea y linfática = 0 (Q1). Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre la expresión de RANK y los marcadores pronósticos clásicos, así como la ocurrencia de metástasis, la ocurrencia de metástasis óseas, la ocurrencia de metástasis viscerales, la ocurrencia de metástasis mixtas y recidiva local. Los análisis de supervivencia, que incluyeron RFS, MFS, BMFS, VMFS, mix-MFS y OS, se llevaron a cabo utilizando el método de Kaplan-Meier y las diferencias se evaluaron mediante la prueba de log-rank (Mantel-Cox) [26]. El análisis de sobrevida multivariado

se realizó utilizando el modelo de riesgos proporcionales de Cox con selección inversa por pasos (razón de verosimilitud). Solo se consideraron las variables significativas identificadas en el análisis univariable. Se estableció un nivel de significancia menor de 0,05 para todos los análisis. El análisis estadístico fue realizado por un estadístico experimentado utilizando el software SPSS (versión 18.00, Chicago, Illinois).

Análisis prospectivo.

Selección de pacientes.

Se llevó a cabo un estudio prospectivo utilizando fibroblastos asociados al tumor obtenidos del tejido tumoral durante la cirugía de 10 pacientes con carcinoma ductal infiltrante en estadio temprano de mama (I/II). Se excluyeron a los pacientes que habían recibido terapia neoadyuvante, tenían antecedentes de tumores previos o tenían un tamaño de muestra insuficiente (<1 cm). Las muestras fueron proporcionadas por el Servicio de Patología de Mama del Hospital Italiano, CABA. Este estudio fue aprobado por los Comités de Ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) y del Hospital Italiano. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes o sus familiares (aprobación del IBYME: CE 050 y aprobación del Hospital Italiano: nº5009). La investigación se realizó de acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki. Para proteger la privacidad de los pacientes, los registros médicos fueron anonimizados mediante un código numérico.

Aislamiento y expansión de fibroblastos asociados al tumor (CAFs) a partir del tejido primario del cáncer de mama.

Inmediatamente después de la mastectomía, los tejidos se colocaron en DMEM-F12 (#12500-062, Gibco). Posteriormente, se lavaron con el mismo medio suplementado con una solución de antibiótico-antimicótico (ATB/ATM) (Gibco, Cat.15240) que contenía una concentración final de 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 25 µg/ml de anfotericina B y 2 mM de L-glutamina (en adelante denominado medio suplementado). El tejido se fragmentó con un bisturí en una placa de cultivo de tejidos y se trató con colagenasa/hialuronidasa tipo III al 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante toda la noche a 37°C con agitación suave. Después de este período, la muestra se centrifugó a 40g durante 2 minutos. El pellet resultante rico en organelas, así como el tejido no dispersado, se descartó. El sobrenadante obtenido se transfirió y se centrifugó nuevamente a 100g durante 2 minutos. El pellet obtenido en este paso está enriquecido en células epiteliales, mientras que el sobrenadante está enriquecido en fibroblastos, la fracción celular de interés. Se realizó una centrifugación final del sobrenadante a 200g durante 5 minutos. El pellet resultante rico en fibroblastos se resuspendió en medio α suplementado. El recuento celular se realizó utilizando una solución de ácido acético al 3% en agua, y la viabilidad de los fibroblastos se determinó mediante la prueba de exclusión de azul de tripán con 0,04% de azul de tripán en PBS.

Para los cultivos primarios, se incubaron 375.000 células por frasco de cultivo de 25 cm^2 en 10 ml de medio α suplementado con 20% de suero fetal bovino (SBF) (Natocor). Después de 24 horas, se cambió el medio para eliminar las células no adherentes. Las incubaciones se realizaron a 37°C, 5% de CO2 y humedad. El medio se renovó cada 7 días, y cuando el cultivo alcanzó el 70-80% de confluencia, las células adherentes se trataron con una solución de tripsina-EDTA (0,05%-0,02% en PBS; Gibco, Cat. 15400) para desadherirlas. Las células obtenidas en este primer subcultivo son células estromales mesenquimales, en su mayoría conformadas por células estromales diferenciadas, en

particular, CAFs. Para simplificar, de ahora en adelante las llamaremos CAFs. Para disminuir la densidad celular, los CAFs del primer subcultivo se dividieron en dos frascos de cultivo de 25 cm^2 y se incubaron en medio α suplementado con 20% de SBF. El medio de cultivo se renovó cada 7 días hasta que alcanzaron nuevamente el 70-80% de confluencia. En ese punto, los CAFs del segundo subcultivo se tripsinizaron y se separaron la población de fibroblastos CD34(-) utilizando una columna de separación magnética (Anti-PE Multisort Kit: #130-091-271, MACS Miltenyibiotec, Ab anti CD34-PE: #130-098-140, MACS Miltenyibiotec). Posteriormente, la fracción de CAFs CD34(-) se tripsinizó y se incubó a una concentración de 240 células viables/cm^2. La baja densidad celular promueve la auto-renovación de las MSCs y, por lo tanto, de los fibroblastos derivados de ellas. Los cultivos se incubaron con medio α suplementado con 20% de SBF. Para aumentar el rendimiento celular, los fibroblastos CD34(-) se sembraron a 3.000 células viables/cm^2 y se mantuvieron cambiando el medio cada 7 días hasta alcanzar el 70-80% de confluencia. Esta fracción celular se utilizó para los ensayos restantes.

Caracterización fenotípica de las poblaciones de fibroblastos CD34(-).

Un total de $3x10^5$ células de cada subpoblación fueron centrifugadas a 1.100 rpm durante 5 minutos y re-suspendidas en 50 µl de PBS con 1% de albúmina sérica bovina (BSA; Santa Cruz, Cat. sc-2323). Posteriormente, las células fueron incubadas con anticuerpos monoclonales específicos conjugados con diferentes fluorocromos dirigidos contra los siguientes antígenos humanos durante 30 minutos a temperatura ambiente: RANK, CD105, CD34, CD90, CD73, FAP, CD19 y CD14. Los detalles de cada anticuerpo, junto con sus respectivos controles isotípicos, se resumen en la Tabla 3. Se utilizaron las concentraciones recomendadas por los fabricantes para cada anticuerpo en el análisis de citometría de flujo. Los controles se evaluaron simultáneamente utilizando la misma concentración de proteína que los anticuerpos primarios correspondientes. Después de la incubación, las células de cada tubo fueron lavadas dos veces con 1% de PBS-BSA y centrifugadas a 1.100 rpm durante 4 minutos en cada lavado. Finalmente, las células se re-suspendieron en 100 µl de PBS y se analizaron 10.000 eventos en cada caso utilizando citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences). Se utilizó el software FlowJo para analizar los datos, con controles isotípicos utilizados para ubicar adecuadamente los cuadrantes de análisis y obtener índices de fluorescencia relativos (RFI: índice de fluorescencia específica de la molécula de superficie / índice de fluorescencia del control isotípico específico).

Controles de isotipo y anticuerpos anti-	Tipo de Ig	Aplicación	Concentración	Fabricante y catálogo
RANK	IgG1, ratón	CF, IHQ	0,25 µg/106 cels, 1/20	MAB683, RyD systems
CD105	IgG, cabra	CF	0,25 µg/106 cells 1/40	AF1097, RyD systems
FAP-PE	IgG1, ratón	CF	10 µL/106 cels	FAB3715P, RyD systems
CD73-APC	IgG2B, ratón	CF	10 µL/106 cels	FAB5795A, RyD systems

CD90-alexa 488	IgG2A, ratón	CF	5 µL/106 cels	FAB2067G, RyD systems
CD34-PE	IgG1, ratón	CF	10 µL/106 cels	FAB7227P, RyD systems
CD14-PE	IgG1, ratón	CF	10 µL/106 cels	FAB3832P, RyD systems
CD19-APC	IgG1, ratón	CF	10 µL/106 cels	FAB4867A, RyD systems
Ac secundario anti ratón-Alexa 488 (Crtl isotipo RANK)	IgG1, ratón	CF, IF	1/100	715545150, Jackson-immunoresearch
Ac secundario anti cabra-Alexa 647 (Crtl isotipo CD105)	IgG, cabra	CF, IF	1/100	705605147, Jackson Immunoresearch
Crtl isotipo FAP, CD34, CD14	IgG1, ratón	CF	10 µL/106 cels	IC002P, RyD systems
Crtl isotipo CD90	IgG1, ratón	CF	5 µL/106 cels	IC002G, RyD systems
Crtl isotipo CD73	IgG2B, ratón	CF	10 µL/106 cels	IC0041A, RyD systems
Crtl isotipo CD19	IgG1, ratón	CF	10 µL/106 cels	IC002A, RyD systems
Ctrl isotipo RANK	IgG1, ratón	IHQ	1/50	X0931, DAKO

Tabla 3. Detalles de los anticuerpos (Acs) y controles de isotipo usados en los distintos protocolos. CF: citometría de flujo; IHQ: inmunohistoquímica e IF: inmunofluorescencia.

Evaluación mediante inmunofluorescencia de la co-expresión de RANK y CD105 en CAFs aislados de tejido mamario fresco y en muestras de parafina.

Los CAFs aislados del tejido tumoral mamario se sembraron en portaobjetos a una densidad de 350,000 células/ml. Luego, se fijaron con metanol durante 15 minutos y posteriormente se hidrataron con TBS-TW20 al 0,1% durante 10 minutos. Para realizar la inmunofluorescencia de doble marcación, en primer lugar, se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario anti-RANK (#MAB683, RyD Systems). En el segundo día, se llevaron a cabo lavados exhaustivos con PBS 1X seguidos de la incubación con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con Alexa 488 (715545150, Jackson-immunoresearch). Luego, se realizó una incubación durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-CD105 (#AF1097, RyD Systems). El tercer día, se realizaron dos lavados con PBS 1X con Tween 20 al 0,1%, seguidos de la incubación con un anticuerpo secundario anti-cabra marcado con Alexa-647 (705605147, Jackson Immunoresearch). Posteriormente, se realizó la contratación utilizando DAPI, seguido de un lavado con agua destilada, y finalmente, las muestras se montaron utilizando Vectashield. Los CAFs que expresaban RANK (+) y CD105 (+) se visualizaron mediante un microscopio confocal (60X). Para llevar a cabo la inmunofluorescencia en tejido tumoral mamario embebido en parafina, se siguió el mismo procedimiento, con la diferencia de que el procesamiento inicial de la muestra se realizó como se mencionó previamente en el estudio retrospectivo [7].

Ensayo de unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F).

Las células estromales CD34(-) (*CAFs-like*) aisladas se plaquearon a una densidad de 100 células/cm^2 en frascos de cultivo de 25 cm^2 conteniendo: **i)** 10 ml de medio α suplementado y **ii)** 10 ml de medio α suplementado con 25 ng/ml de RANKLrh. Las células se incubaron en un entorno humidificado a 37°C con un 5% de CO2 durante 7 días. Después de este período, se renovó el medio de cultivo. Luego 7 días, las células estromales se lavaron 2 veces con PBS, se fijaron con metanol al 100% (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 15 minutos y finalmente se tiñeron con Giemsa puro (cat. 48900 Sigma, Biopure, St. Louis, MA, EE. UU.) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las colonias que contenían más de 50 células fusiformes se identificaron bajo un microscopio y registraron como CFU-F. La frecuencia de CFU-F se representó mediante la eficiencia de formación de colonias, calculada como el número de CFU-F obtenidos por cada 2.500 CAFs sembrados. Cada muestra se realizó por duplicado. Se calculó el número de CAFs por campo óptico de CFU-F (denominada densidad de células estromales). Para ello, se capturaron diez imágenes de campos ópticos distintos de cada cultivo de CFU-F y se procesaron con el software FIJI [31].

Ensayo de migración.

Los experimentos se realizaron utilizando membranas transwell con un tamaño de poro de 8 μm (PI8P01250, Millipore) en placas de 24 pocillos. En cada pocillo de la placa se colocó **i)** medio α suplementado con 10 % de SBF (control positivo), **ii)** medio α suplementado sin SBF (control basal), **iii)** medio α suplementado con 50 ng/ml de RANKLrh (# GF091, RyD Systems) y **iv)** medio α suplementado con 50 ng/ml de RANKLrh y 3,3 ug/ml de anticuerpo anti-RANKL (#MAB626, RyDsystems) o **v)** medio α suplementado con50 ng/ml de RANKLrh y 5 ug/ml de anticuerpo anti-RANK (#MAB683, RyDSystems). Posteriormente, se sembraron los transwells con $4x10^4$ células fibroblásticas CD34(-). El ensayo se detuvo a las 14 horas fijando las membranas porosas en metanol puro durante 10 minutos a. Luego, las membranas se lavaron con agua, y las células restantes que no migraron en la superficie de la membrana se eliminaron con un hisopo de algodón húmedo. Las membranas se dejaron secar, tiñéndose con 0,05 % de cristal violeta preparado en metanol durante 10 minutos y observándolas bajo un microscopio de fluorescencia invertido, donde se tomaron fotos de 5 campos delimitados con una magnificación de 200X. Luego se contaron las células migradas utilizando el programa de software Image J. Los resultados se expresaron como el aumento porcentual en la migración hacia el medio respectivo en comparación con el valor basal.

Ensayo de proliferación.

Los fibroblastos CD34(-) viables se sembraron a una densidad de 5×10^3 células por pocillo y se cultivaron en placas de 96 pocillos (cat. 4430100, Orange Scientific, Bélgica) con 200 μl de α-MEM suplementado durante 24 horas. Posteriormente, los cultivos se lavaron con PBS e incubaron durante 48 horas en α-MEM suplementado sin rojo fenol (α-MEM-sinRF, cat. 41061029, Gibco, Grand Island, NY, USA). Finalmente, las células se lavaron con PBS e incubaron durante 48 horas adicionales a 37°C, 5% de CO2 y humedad en: **i)** α-MEM-sinRF suplementado con 5% de SBF, **ii)** α-MEM-sinRF suplementado con 10% de SBF y **iii)** α-MEM-sinRF suplementado con 25 ng/ml RANKLrh. La proliferación celular se evaluó utilizando el Ensayo de Proliferación Celular No Radiactivo CellTiter 96 AQueous (cat. G5421, Promega, Madison, WI, USA)

siguiendo las instrucciones del fabricante. La densidad óptica (DO) se midió a 490 nm utilizando un lector de microplacas. El valor de cada muestra se calculó restando la DO del control (cultivado en condiciones α-MEM basal) de su valor respectivo. Todos los experimentos se realizaron en triplicado para cada muestra.

Análisis estadístico.

Los resultados se presentaron como la media ± error estándar (ES). La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos paramétricos se analizaron utilizando una prueba t no pareada con corrección de Welch para determinar las diferencias entre grupos. Todas las pruebas estadísticas fueron de dos colas. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad 6 Prism (GraphPad Prism versión 6.01, GraphPad Software, La Jolla CA, USA). La significación estadística se definió como $p < 0,05$.

RESULTADOS

Estudio retrospectivo.

Expresión de RANK en células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura, CD34 (-), y su asociación con las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de mama.

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la asociación entre la expresión de RANK en las células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura, CD34 (-), fibroblasts like, y parámetros clínicos tales como el estado de RE, RP y Her2/neu, tamaño del tumor, edad, grado histológico y estado de los ganglios linfáticos regionales (Tabla 4).

Sin embargo, se encontró que la expresión de RANK en los fibroblastos asociados al tumor se relacionó con la aparición de metástasis en las pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos (I/II). Una alta expresión de RANK se asoció significativamente con un mayor riesgo de desarrollar metástasis ($p=0,006$, tabla 4). Aunque no se encontró una asociación significativa entre la expresión de RANK y la aparición de metástasis en sitios específicos, se observa una tendencia de asociación con el evento de metástasis óseas. Aquellas pacientes con una elevada expresión de RANK presentaron metástasis óseas ($p=0,069$) (Tabla 4). La expresión de RANK también se asoció con el número de focos metastásicos por órgano ($p=0,005$) (Tabla 5). Se encontró que las pacientes con una alta expresión de RANK presentaron múltiples focos dentro del mismo órgano (Tabla 5).

La expresión de RANK se relacionó significativamente con MFS, BMFS, MMFS y OS ($p=0,033$, $p=0,003$, $p=0,042$ y $p=0,025$, respectivamente) (Figura 2). Las pacientes con alta expresión de RANK presentaron tiempos más cortos de MFS (169,59 ± 9,55 meses), BMFS (186,65 ± 10,53 meses), MMFS (176,95 ± 2,13 meses) y OS (178,03 ± 8,99 meses) en comparación con el grupo de pacientes con baja expresión de RANK (205,05 ± 5,39, 261,28 ± 1,5, 219,07 ± 9,88 y 226,67 ± 6,58 meses, respectivamente) (Figura 2).

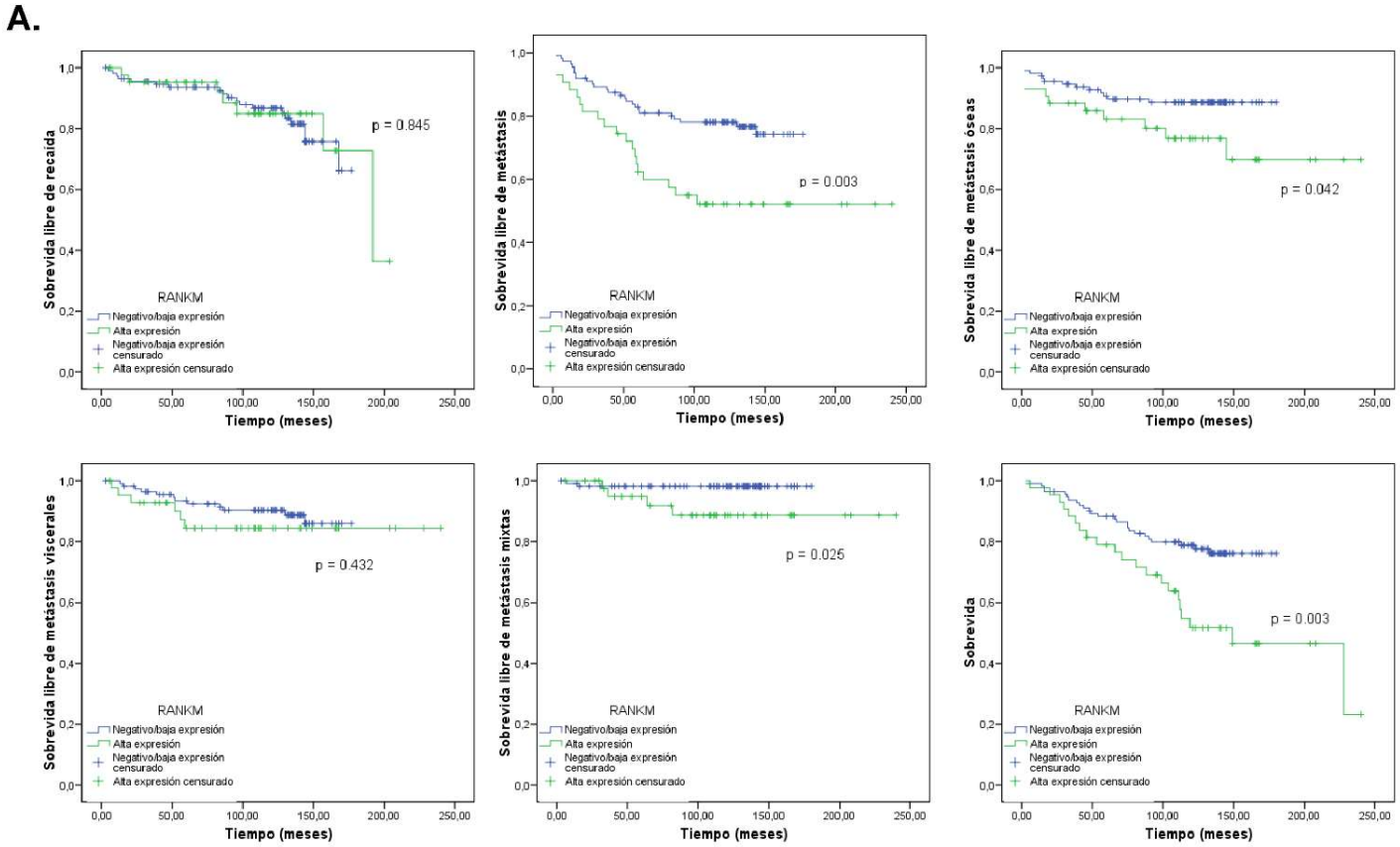
Características clínico-patológicas		RANK			
		n	Alta expresión		*p*
			n	%	
Edad (años)	<50	42	12	28,57	1
	≥50	113	31	27,43	
Tamaño tumoral (cm)	≤2	111	27	24,32	0,164
	>2	44	16	36,36	
RE	Negative	19	4	21,05	0,593
	Positive	136	39	28,68	
RP	Negative	31	7	22,58	0,654
	Positive	124	36	29,03	
Her2/neu	Negative	137	40	29,20	0,157
	Positive	18	2	11,11	
Grado histológico	G1	12	4	33,33	0,670
	G2	89	26	29,21	
	G3	54	13	24,07	
Ganglios linfáticos locoregionales	Negative	106	30	28,30	0,850
	Positive	49	13	26,53	
Recaída local	Negative	129	36	27,91	1
	Positive	26	7	26,92	
Ocurrencia metastásica	Negative	109	23	21,10	0,006
	Positive	46	20	43,48	
Ocurrencia metastásica ósea	Negative	133	33	24,81	0,069
	Positive	22	10	45,45	
Ocurrencia metastásica visceral	Negative	137	37	27,01	0,582
	Positive	18	6	33,33	
Ocurrencia metastásica mixta	Negative	149	39	26,17	0,050
	Positive	6	4	66,67	

Tabla 4. Asociación de la expresión de RANK en células estromales con características clínico-patológicas (marcadores pronósticos clásicos), ocurrencia local, ocurrencia de metástasis, ocurrencia de metástasis óseas, ocurrencia de metástasis viscerales y ocurrencia de metástasis mixtas en 155 pacientes con cáncer de mama ductal invasivo temprano. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para la asociación entre variables, * valor de $p < 0,050$. RE *receptor de estrógeno*; RP rec*eptor de progesterona*.

Características del foco metastásico	*n*	*# focos metastásicos*	
		>1 foco (n)	*p*
RANK			
Baja expresión	229	20	**0,001**
Alta expresión	113	25	

Tabla 5. Asociación de la expresión de RANK en células estromales con el número (#) de focos metastásicos por órgano en general. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para la asociación entre variables, * valor de p < 0,050.

A.



B.

RANK	*Sobrevida libre de recaida*		*Sobrevida libre de metástasis*		*Sobrevida libre de metástasis óseas*		*Sobrevida libre de metástasis viscerales*		*Sobrevida libre de metástasis mixtas*		*Sobrevida general*	
	Tiempo (meses)	p	Tiempo (meses)	p	Tiempo (meses)	p	Tiempo (meses)	p	Tiempo (meses)	p	Tiempo (meses)	p
Negativa/baja expresión	173,02 ± 9,71	0,845	179,04 ± 7,59	0,003	187,33 ± 14,49	0,042	214,45 ± 5,66	0,432	219,07 ± 9,88	0,025	180,45 ± 7,43	0,003
Alta expresión	156,06 ± 4,45		145,19 ± 5,60		163,85 ± 4,44		208,24 ± 11,96		176,95 ± 2,13		150,13 ± 13,76	

Figura 2. Asociación de la expresión de RANK con la supervivencia libre de recidiva local, tiempo libre de metástasis, tiempo libre de metástasis óseas, tiempo libre de metástasis viscerales, tiempo libre de metástasis mixtas y sobrevida global en pacientes con cáncer de mama ductal invasivo temprano. **A.** Curvas de Kaplan-Meier (análisis univariado) marcadas en verde representan datos de muestras con alta expresión de RANK, mientras que las curvas azules representan muestras con expresión negativa/baja de RANK. Se utilizó la prueba de Log Rank

(Mantel-Cox) para evaluar las curvas de Kaplan-Meier. * Valor de p <0,050. **B.** Detalles de los tiempos libres de recidiva local, de metástasis, de metástasis óseas, de metástasis viscerales, de metástasis mixtas y sobrevida global correspondientes a los grupos de negativa/baja y alta expresión de RANK.

Expresión de RANK en células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura, CD34 (-), y su asociación con características del estroma intratumoral.

La expresión de RANK se asoció con el porcentaje de estroma intratumoral y la vascularización sanguínea y linfática (p=0,029, p=0,013 y p=0,006, respectivamente, tabla 6). De las pacientes con alta expresión de RANK, el 58,14% presentó un alto porcentaje de estroma intratumoral (Tabla 6). En cuanto a la vascularización, la alta expresión de RANK se asoció con una mayor cantidad de vascularización sanguínea y linfática (Tabla 6).

Características del estroma tumoral mamario		**RANK**	
		total	Alta expresión
% estroma intratumoral	***> 50***	67	25
	p	**0,029**	
% fibroblastos	***Cantidad abundante***	15	5
	p	0,562	
Deposición de colágeno	***Cantidad abundante***	85	27
	p	0,280	
Infiltración linfática	***Cantidad abundante***	20	8
	p	0,192	
Desmoplasia	***Cantidad abundante***	95	27
	p	0,085	
Cambios mixoides	***Cantidad abundante***	96	30
	p	0,352	
Vascularización sanguínea	***Cantidad abundante***	46	18
	p	**0,013**	
Vascularización linfática	***Cantidad abundante***	44	18
	p	**0,006**	
Total		155	43

Tabla 6. Asociación entre características histológicas estromales y la expresión de RANK en una cohorte de 155 pacientes con cáncer de mama temprano. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para la asociación entre variables, * valor de p < 0,050.

Asociación entre los marcadores pronósticos clásicos y la progresión del tumor.

El estado de RE, el estado de RP, el tamaño del tumor y el grado histológico se asociaron significativamente con un peor pronóstico en las pacientes con PCM en nuestra cohorte. Las pacientes con RE (-) tuvieron un MFS, BMFS, VMFS y OS más baja (p=0,0001, p=0,001, p=0,001, p=0,0001, respectivamente). Además, las pacientes con RP (-) tuvieron un MFS, BMFS y OS más baja (p=0,003, p=0,013 y p=0,001, respectivamente). Aquellas pacientes con un tamaño de tumor >2 cm presentaron un MFS, BMFS, VMFS y OS más baja (p=0,0001, p=0,003, p=0,001 y p=0,0001, respectivamente). Además, las PCM con un grado de diferenciación alto (G3) presentaron un MFS y OS más baja (p=0,002 y p=0,006, respectivamente) (Datos no mostrados).

Análisis multivariado.

La expresión de RANK fue un factor pronostico independiente del MFS y la OS en nuestras pacientes con cáncer de mama (p=0,007 y 0,004, respectivamente) (Tabla 7).

Eventos	Características	RR	95% C.I.	*p*
Tiempo libre de metástasis	RE	0,407	0,137-1,209	0,106
	RP	0,882	0,327-2,376	0,804
	Tamaño tumoral	2,42	1,194-4,905	0,014
	Grado histológico	1,602	0,854-3,004	0,142
	RANK	2,290	1,259-4,166	**0,007**
Tiempo libre de metástasis óseas	RE	0,462	0,101-2,122	0,321
	RP	0,570	0,152-2,137	0,405
	Tamaño tumoral	2419	0,951-6,154	0,064
	RANK	2,26	0,965-5,293	0,06
Tiempo libre de metástasis viscerales	RE	0,296	0,099-0,888	0,03
	Tamaño tumoral	3,386	1,261-9,091	0,015
	RANK	1,384	0,509-3,761	0,524
Sobrevida general	RE	0,337	0,109-1,037	0,058
	RP	0,84	0,299-2,363	0,742
	Tamaño tumoral	2,613	1,312-5,204	0,006

	Grado histológico	1,486	0,791-2,791	0,219
	RANK	2,469	1,343-4,541	**0,004**

Tabla 7. Análisis multivariado del tiempo libre de metástasis, tiempo libre de metástasis óseas, tiempo libre de metástasis viscerales y sobrevida general en 155 pacientes con cáncer de mama ductal invasivo temprano. C.I.: Intervalo de Confianza; HR: Razón de Peligro. Prueba estadística: Modelo de proporciones de riesgo de Cox (selección hacia atrás), * valor de p < 0,050. RE *receptor de estrógeno*, RP *receptor de progesterona*.

Estudio prospectivo.

Caracterización fenotípica de células estromales fusiformes CD34(-) aisladas de pacientes con cáncer de mama.

A partir del análisis fenotípico realizado mediante citometría de flujo, se observó que las células estromales fusiformes (*fibroblasts like*) estudiadas presentaban expresión de marcadores tanto de CAFs como de MSCs. Observamos que nuestra población celular tenía una expresión del 97,1% para CD90, 98,3% para CD73, 23,2% para CD105, así como un 66,8% para FAP (Figura 3). En relación al marcador RANK, encontramos que estaba expresado en un 31,8% (Figura 3). Con respecto a los marcadores CD34, CD14 y CD19, encontramos un porcentaje de expresión bajo, considerado como negativo (1,51%, 2,25% y 2,68%, respectivamente) (Figura 3).

Además, se identificó que un 30% de las células estromales aisladas del tumor primario co-expresan tanto el marcador RANK como CD105 (Figura 4, paneles A y B). Esta misma co-expresión se evidenció en el tejido de cáncer de mama embebido en parafina (Figura 4, panel C).

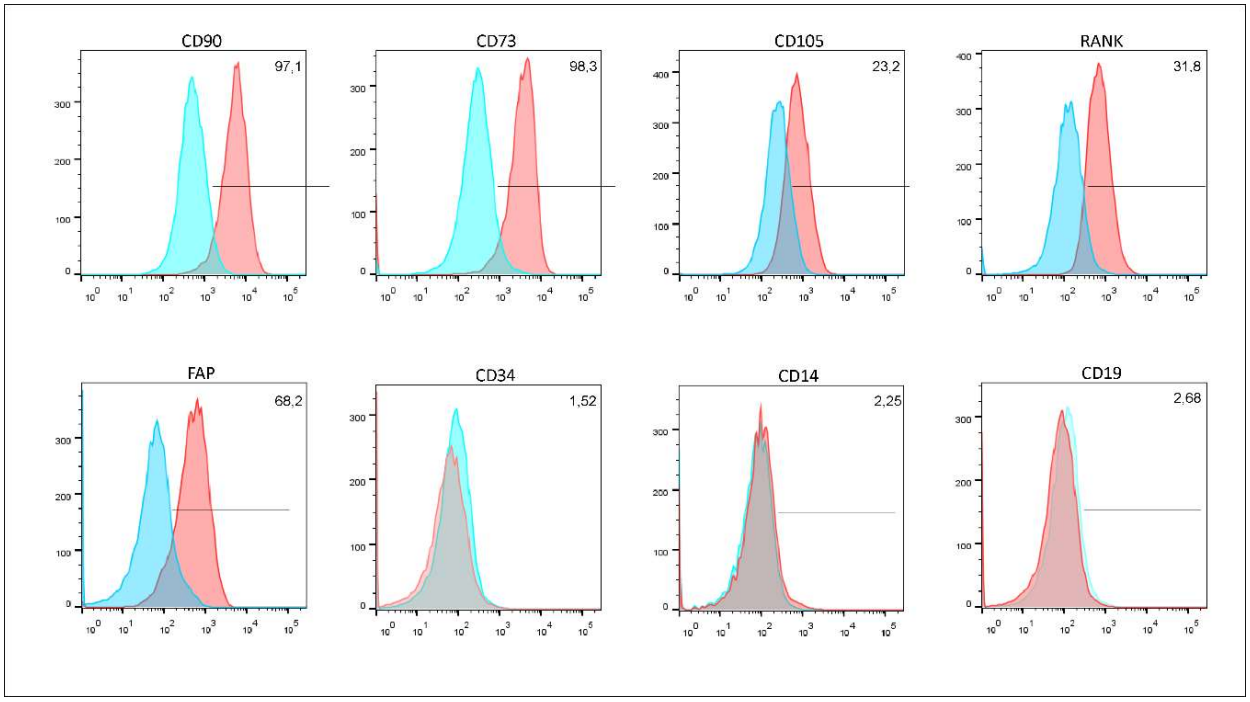


Figura 3. Caracterización fenotípica de los CAFs CD34(-). Histogramas representativos de citometría de flujo de antígenos de superficie de CAFs de un paciente con cáncer de mama (PCM) representativo. (•) Control de isotipo.

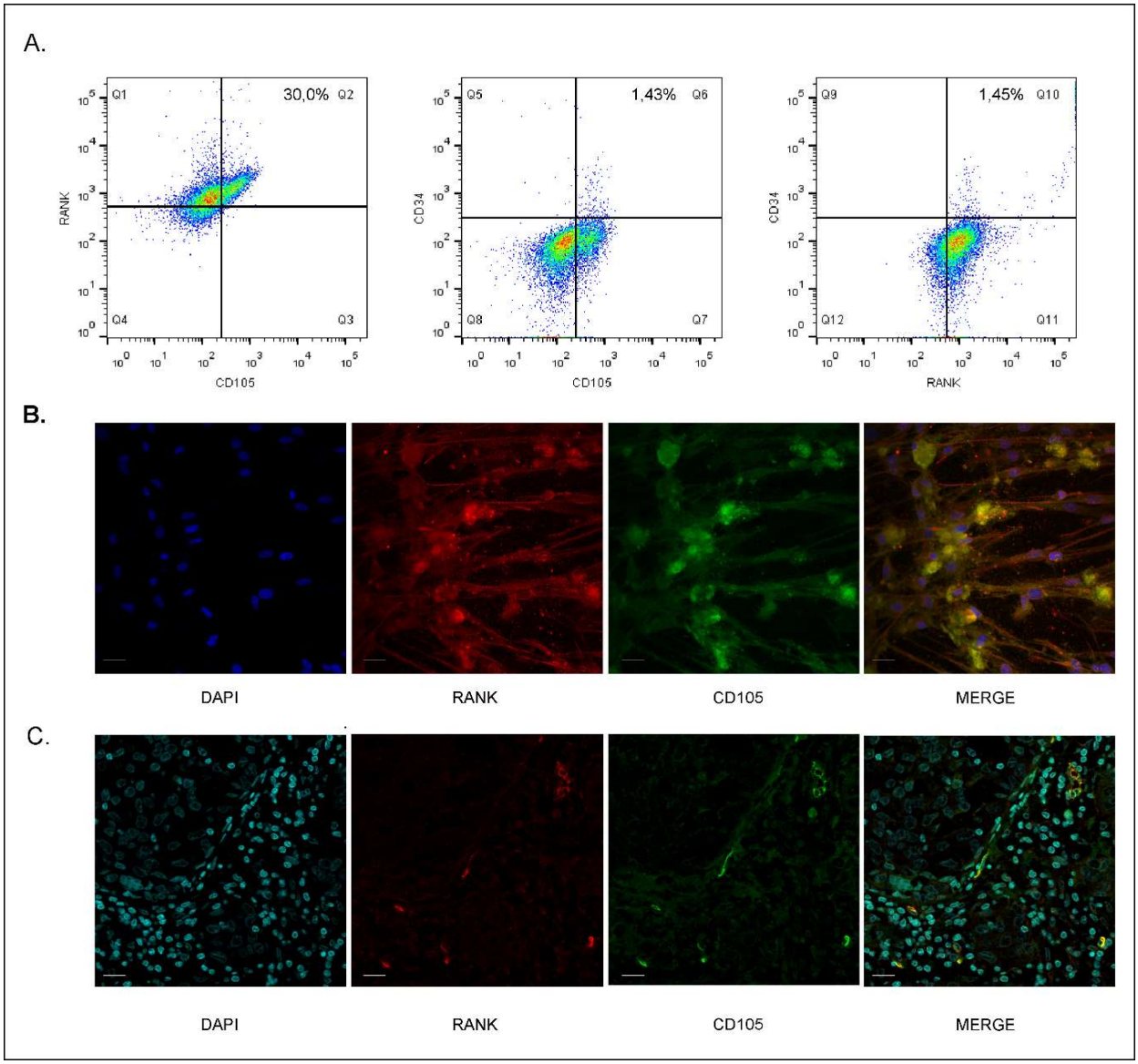


Figura 4. Coexpresión de RANK y CD105 en los fibroblastos asociados al tumor (CAF) del tumor mamario. **A.** Dot-plot representativo de la co-expresión de RANK-CD105, CD34-CD105 y CD34-RANK en fibroblastos aislados del tumor primario de pacientes con cáncer de mama estadios tempranos (I/II). **B.** Representación de la doble marcacion de RANK (rojo) y CD105 (verde) por inmunofluorescencia en fibroblastos CD34(-) aislados del tumor primario de pacientes con cáncer de mama estadios tempranos (I/II). Contra-tinción con DAPI. Magnificación 400X. La escala corresponde a 50 µm. **C.** Representación de la doble marcación de RANK (rojo) y CD105 (verde) por inmunofluorescencia en tejidos mamario embebido en parafina de pacientes con cáncer de mama estadios tempranos (I/II). Magnificación 200X. La escala corresponde a 200 µm.

Capacidad de originar unidades formadoras de colonias fibroblásticas (*CFU-F*).

No encontramos diferencias en la capacidad de formación de CFU-F entre los CAFs CD34(-) tratados con αMEM + 5% SBF + 25 ng/ml RANKLrh y aquellos sin tratamiento de RANKL (αMEM +5% SBF solo) (Figura 4). Tampoco se encontró diferencias en el número de CAFs / campo óptimo, en el área celular, en el eje longitudinal ni horizontal (Figura 4).

Capacidad de proliferación.

En cuanto al análisis de proliferación realizado mediante el ensayo de MTS, no observamos un incremento significativo en la proliferación de las células estromales al exponerlas al factor RANKLrh en comparación con el control positivo (αMEM suplementado con 5% y 10% SBF) (Figura 4).

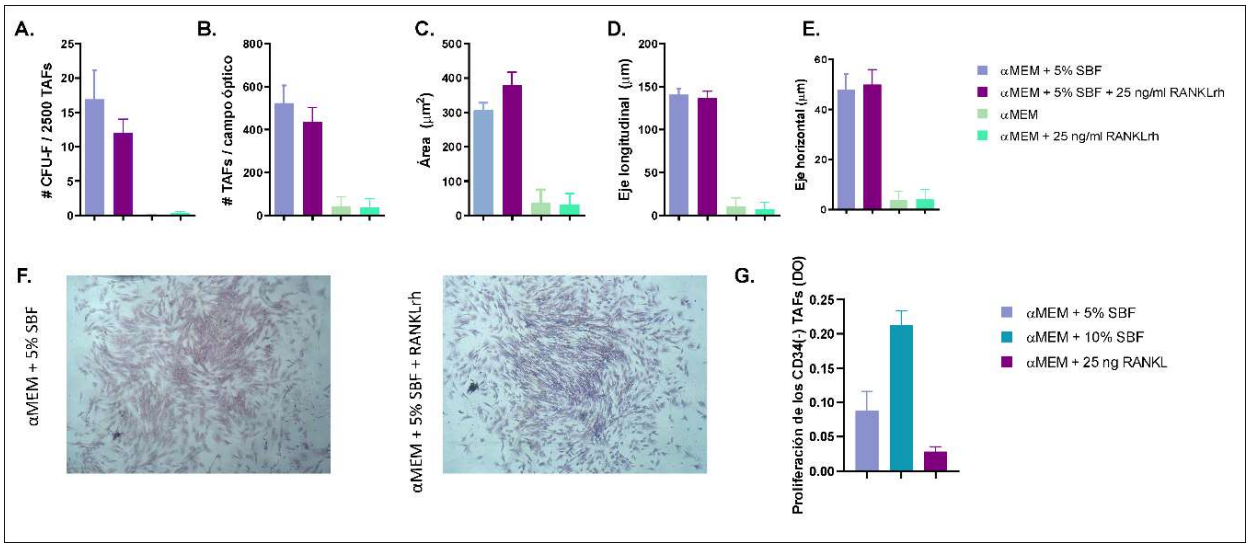


Figura 4. Efecto de RANKL en las habilidades de autorenovación y proliferación de los fibroblastos asociados al tumor (CAFs) CD34(-) en pacientes con cáncer de mama (PCM). **A.** Ensayo de unidades formadoras de colonia fibroblásticas (CFU-F): La autorrenovación de los CAFs CD34(-) en PCM (n=9) se evaluó en medio base (αMEM) suplementado, con 5% libre de suero (SBF) y sin el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKLrh) (control), y en presencia de RANKLrh (25ng/ml). Los valores se expresan como la media ± error estándar (ES). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t no pareada con la corrección de Welch. Los valores se expresan como la media ± ES. $p<0.05$*. **B.** Densidad de células estromales por campo óptico de microscopio en cada CFU-F (n = 9). **C**. Área de células estromales en regiones típicas de cada cultivo de CFU-F (n = 9). **D.** Longitud de las células estromales en regiones típicas de los cultivos de CFU-F (n = 9). **E.** Ancho de las células estromales en regiones típicas de los cultivos de CFU-F (n = 9). **F.** Tamaño de las CFU-F en αMEM suplementado con 5% de SBF y en αMEM suplementado con 5% de SBF + 25 ng/ml de RANKLrh. Tinción de Giemsa (40 X). **G.** Capacidad de proliferación de los CAFs CD34(-). La proliferación de los CAFs CD34(-) en PCM (n=9) se evaluó en αMEM suplementado con un 5% y un 10% SBF, sin RANKLrh, y en presencia de 25 ng/ml RANKLrh. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t no pareada con la corrección de Welch. Los valores se expresan como la media ± ES. $p<0.05$*.

Capacidad de migración.

Las células estromales CD34(-), poseen una capacidad migratoria ante la estimulación con RANKLrh. Sin embargo, esta capacidad migratoria se inhibió al agregar un anticuerpo anti RANKL al ensayo. Del mismo modo, al realizar el estudio con el bloqueo del receptor de RANKL, RANK, utilizando un anticuerpo anti RANK, se observó un efecto similar de reducción en la migración (Figura 5).

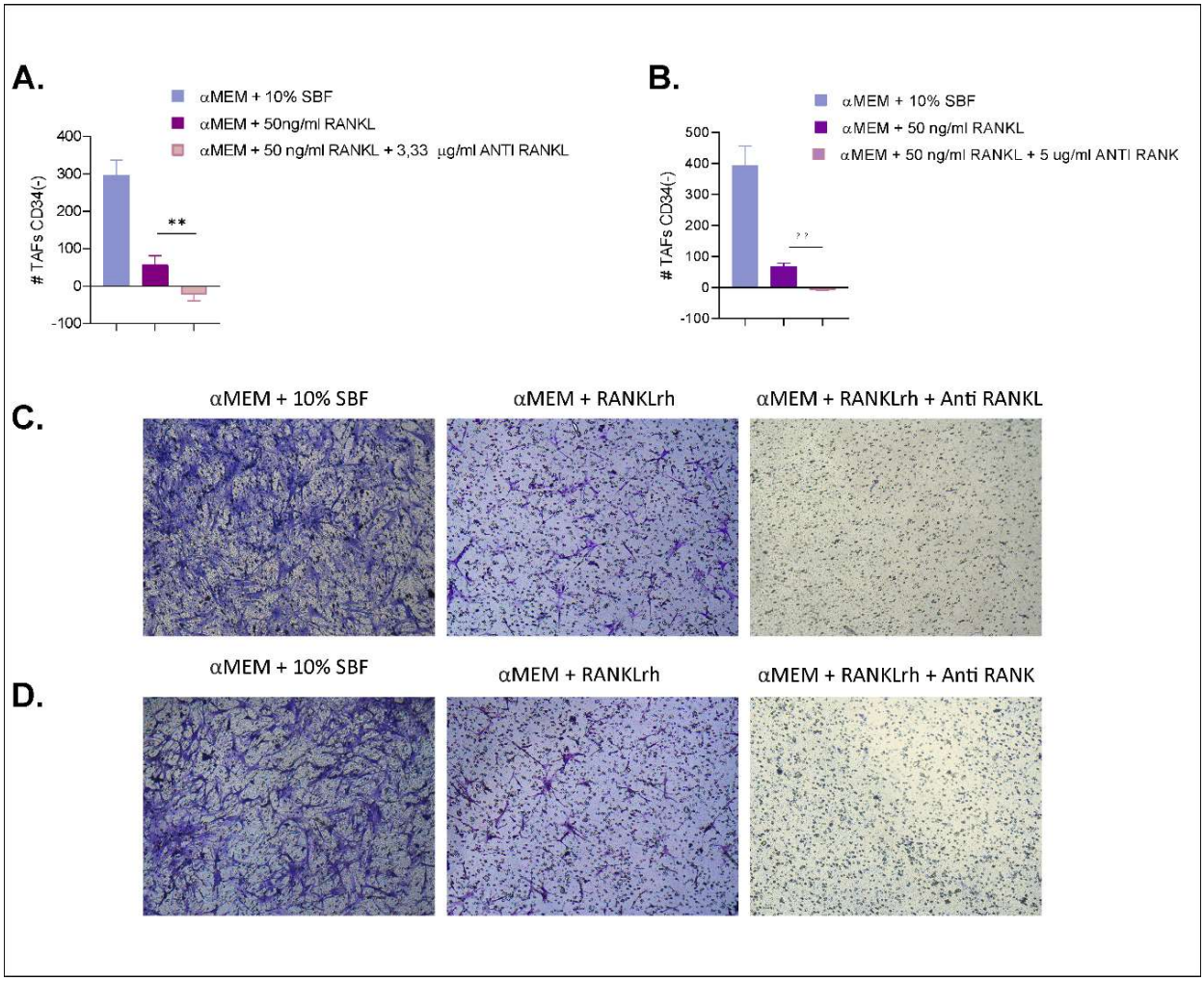


Figura 5. Efectos de RANKL en las capacidades de migración en transwell de fibroblastos asociados a tumores (CAFs) CD34(-) de pacientes con cáncer de mama (PCM). Se evaluó la migración de los CAFs CD34(-) en PCM (n=9) en un medio base suplementado (αMEM) con **I)** 10% de suero bovino fetal (SBF) y sin el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKLrh) (control positivo), **II)** αMEM con 50 ng/ml de RANKL, **III)** αMEM con 50 ng/ml de RANKL y 3,3 µg/ml de anticuerpo anti RANKL y **IV)** αMEM con 50 ng/ml de RANKL y 5 µg/ml de anticuerpo anti RANK. Los valores se expresan como la media ± error estándar (ES). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t no pareada con la corrección de Welch, p=0.0164*.

DISCUSIÓN

El sistema RANK/RANKL ejerce un control crucial sobre la formación de osteoclastos y la regulación del metabolismo óseo [8]. Dentro del sistema RANKL/RANK, RANKL actúa como el ligando de RANK, facilitando en última instancia la maduración de los precursores de osteoclastos [32]. No obstante, existe extensa documentación que respalda la presencia de RANK en diversos órganos y tipos celulares funcionales, como osteoclastos, células endoteliales vasculares, glándulas mamarias, células del sistema inmunológico y ciertas células cancerosas, incluyendo los cánceres de mama y próstata. Estos dos tipos de tumores tienen una marcada tendencia a metastatizar en el tejido óseo [33–35]. Por lo tanto, este sistema desempeña un papel esencial en una serie de funciones fisiológicas fundamentales que van más allá de la biología ósea. Este receptor no sólo desempeña un papel fundamental en la regulación de la remodelación ósea sino también en las respuestas inmunitarias y el desarrollo de las glándulas mamarias [33, 36]. En el presente trabajo, nos resultó de particular interés estudiar su presencia y posible rol en los CAFs del microambiente tumoral de PCM temprano. Nuestro estudio retrospectivo, enfocado en la expresión de RANK en los CAFs y su asociación con características clínico-patológicas, brinda información valiosa sobre el papel de este tipo celular en la progresión y pronóstico del cáncer de mama. Se encontró que la expresión de RANK en los CAFs-CD34(-) estaba claramente relacionada con la aparición de metástasis. Específicamente, se determinó que una alta expresión de RANK se asoció significativamente con un mayor riesgo de desarrollar metástasis. Aunque no se estableció una asociación significativa entre la expresión de RANK y la aparición de metástasis en sitios específicos, la tendencia hacia una asociación con metástasis óseas sugiere un posible papel en este tipo particular de evento metastásico. La relación observada entre la expresión de RANK y el número de focos metastásicos por órgano resalta aún más la importancia de la señalización de RANK en los procesos metastásicos. Aunque no existen estudios que hayan evaluado la expresión de RANK en el tumor primario como un factor pronóstico, hay investigaciones que sugieren que RANKL podría servir como un marcador útil para evaluar la respuesta ósea en pacientes con metástasis, permitiendo detectar desequilibrios en la homeostasis ósea [37]. Se sabe que los tumores en el hueso liberan factores de crecimiento que estimulan las células óseas, desencadenando una serie de eventos donde RANKL y RANK desempeñan un papel crucial. Esta interacción estimula la liberación de más factores de crecimiento y promueve el crecimiento del tumor, lo que conduce a la destrucción ósea y un ciclo dañino. Por lo tanto, niveles elevados de RANKL pueden identificar a pacientes con un desequilibrio en la homeostasis ósea hacia la reabsorción ósea [37]. Aún más, la asociación significativa entre la expresión de RANK en los CAFs y el MFS, BMFS, MMFS y OS, resalta el potencial rol de RANK como indicador pronóstico para PCM temprano (I/II). Las pacientes con alta expresión de RANK presentaron un MFS, BMFS y MMFS más corto, así como una OS más baja en comparación con aquellas con baja expresión de RANK. Esto sugiere que la expresión de RANK podría servir como un valioso biomarcador pronóstico para predecir la progresión de la enfermedad y la supervivencia en pacientes con cáncer de mama temprano. Del estudio de la expresión de RANK en relación con las características del estroma intratumoral surgen asociaciones significativas con el porcentaje de estroma intratumoral y la vascularización sanguínea y linfática. Pacientes con elevada expresión de RANK tenían mayor abundancia del estroma intra-tumor, así como también mayor vascularización sanguínea y linfática. Estos resultados sugieren un posible papel de los CAFs RANK (+) en la influencia sobre la composición del microambiente y los patrones de vascularización, factores que pueden desempeñar un

papel crítico en la progresión y metástasis del cáncer de mamá. En el análisis multivariado, la expresión de RANK emergió como un factor pronostico independiente de MFS y la OS en las PCM, reforzando su potencial como un indicador pronóstico, el cual puede proporcionar información adicional más allá de los marcadores pronósticos clásicos. Al respecto, Tsubaki M. y su equipo descubrieron que el sistema RANK/RANKL puede promover la progresión tumoral en líneas celulares de mieloma múltiple al inducir resistencia a la quimioterapia mediante la activación de múltiples vías de señalización. Observaron que la estimulación de RANKL en células que expresan RANK conlleva un aumento en la expresión de proteína de resistencia a múltiples fármacos 1, proteína de resistencia al cáncer de mama y proteína de resistencia pulmonar 1, al tiempo que disminuye la expresión de Bim a través de diversas moléculas de señalización [38]. Además, RANK induce la transición epitelial a mesenquimal y la formación de células madre tumorales, lo que promueve la tumorigénesis y la metástasis [9].

Por otro lado, al llevar a cabo la caracterización fenotípica de los CAFs, CD34(-), aislados del tumor primario, descubrimos que estas células estromales expresan RANK en un 30%. Además, muestran una expresión de marcadores típicos tanto de CAFs (FAP) como de MSCs (CD90, CD73, CD105). Esto sugiere inicialmente que tienen un fenotipo de fibroblasto activado y que posiblemente estas células se originaron a partir de MSCs que podrían haber migrado desde la MO durante las primeras etapas del desarrollo del tumor primario mamario [39, 40].

Las metástasis, especialmente en los huesos, son una complicación común y significativa en muchos pacientes con cáncer, contribuyendo de manera importante a la morbilidad y la mortalidad [41]. Aunque se sabe que el cáncer de próstata y el cáncer de mama tienen una marcada tendencia a metastatizar en los huesos [42], las razones subyacentes de este comportamiento osteotrópico en estos tipos de tumores siguen siendo poco comprendidas. Se ha atribuido un papel crucial al microambiente óseo en facilitar la migración de ciertas células tumorales hacia los huesos. De acuerdo con la teoría "semilla y suelo" de las metástasis óseas, el microambiente óseo actúa como un suelo fértil, enriquecido con factores de crecimiento y citoquinas que atraen a las células tumorales [43]. Dada la alta expresión de RANKL en el entorno de la médula ósea, surge la hipótesis de que RANKL podría funcionar como un quimioatractante para las células tumorales del cáncer de mama y de próstata [9]. Particularmente, a través de nuestro estudio sobre la capacidad de migración observada en respuesta a la estimulación con RANKLrh, así como la inhibición de esta migración tras la adición de un anticuerpo anti RANKL o el bloqueo del receptor RANK, sugieren que esta respuesta está, en principio, mediada por el receptor RANK y posiblemente regulada por la interacción de estas células con factores presentes en el microambiente. En relación, Jones et al. 2006, demuestra que RANKL tiene un rol importante en la migración celular y consecuentemente en el comportamiento metastásico de las células epiteliales tumorales [12]**.** Además Golden et al, demuestra que RANKL induce una respuesta migratoria en los osteoblastos normales que poseen el receptor RANK en membrana [23]**.** Al respecto, en otro estudio *in vitro* de migración, han evidenciado que las células tumorales que contienen RANK se mueven hacia una fuente de RANKL [12]. Por otro lado, los ensayos realizados en cultivos celulares *in vitro* también revelaron que las células MCF10A, con una expresión elevada de RANK, experimentan una transición de tipo epitelial a mesenquimal y muestran un incremento en su capacidad migratoria. Asimismo, la sobreexpresión de RANK en las células MDA-MB-231 aceleró la tasa de crecimiento metastásico en los huesos [44]. Por otra parte, la amplificación de la expresión de RANK en células tumorales portadoras de mutaciones

en el gen supresor de tumores BRCA1 condujo a una mayor capacidad invasiva en estudios *in vitro*, así como a un incremento en el crecimiento tumoral y las metástasis en ratones inmunodeficientes en experimentos *in vivo* [45]. Es relevante resaltar que en tumores mamarios humanos, la presencia elevada de RANK/RANKL se correlacionó de manera significativa con la aparición de metástasis [45]. Por lo tanto, teniendo en cuenta todos estos antecedentes y nuestros resultados preliminares del presente estudio, el sistema RANK/RANKL podría desempeñar un papel relevante en la migración de los CAFs dentro del microambiente tumoral mamario hacia sitios secundarios.

Finalmente, al evaluar la capacidad de proliferación y la formación de CFU-F en respuesta a la estimulación con RANKL, observamos que esta vía de señalización no parece estar directamente vinculada con la proliferación y autorrenovación de los CAFs en nuestro modelo. Al respecto, el grupo Schena et al, encontró, en un modelo murino RANKL-/- , que las MSCs de médula ósea tenían una menor capacidad de clonado así como también una reducción en su capacidad de diferenciación osteogénica [17]**.** No obstante, en nuestro estudio, la falta de un incremento significativo en la proliferación y/o autorrenovación al agregar RANKLrh en comparación con el control positivo (αMEM + 20% SBF) sugiere que la vía de señalización de RANK/RANKL podría no ser un factor determinante en la proliferación de estas células estromales en nuestro contexto particular.

Todos estos resultados en su conjunto contribuyen en parte a una mejor comprensión del rol de los CAFs RANK (+) en el microambiente tumoral y abren vías para investigaciones adicionales sobre terapias dirigidas a la señalización de RANK en el contexto del cáncer de mama. Nuestro estudio retrospectivo revela que la expresión de RANK en el microambiente tumoral tiene un impacto significativo en la progresión y pronóstico del cáncer de mama. Su presencia en los CAFs, no asociados a la vasculatura, se asocia con ocurrencia de metástasis y cambios en el estroma intratumoral, lo que sugiere su utilidad como marcador pronóstico y posible objetivo terapéutico en un futuro. Además, la respuesta migratoria de los CAFs en respuesta al RANKLrh sugiere que el sistema RANK/RANKL estaría involucrado en la vía migratoria de los CAFs a futuros nichos pre- metastásicos. Estos hallazgos respaldan futuras investigaciones y desarrollos clínicos centrados en la vía de señalización de RANK en este contexto.

CONCLUSIÓN

En conjunto, los resultados de los estudios retrospectivo y prospectivo proporcionan una visión integral de la influencia de la expresión de RANK en el microambiente tumoral y su impacto en la progresión y pronóstico del cáncer de mama. La expresión de RANK en los CAFs emerge como un marcador de relevancia clínica, relacionado con la aparición de metástasis y la formación de múltiples focos metastásicos, así como con un peor pronóstico en términos de MFS y OS. Además, se evidencia su participación en la composición del estroma intratumoral y su influencia en la vascularización, destacando su papel en la regulación del en estas células estromales como un potencial marcador pronóstico y una diana terapéutica en el abordaje del cáncer de mama, aportando una base sólida para futuras investigaciones y desarrollos clínicos dirigidos hacia la manipulación de la vía de señalización de RANK/RANKL en este contexto. Por otro lado, la expresión de RANK y su respuesta migratoria a RANKLrh indican una interacción compleja y regulada con el microambiente, mientras que la ausencia de efectos proliferativos directos sugiere que la vía de RANK/RANKL no es un impulsor principal de la proliferación en

este contexto. Estos hallazgos amplían nuestro entendimiento de la versatilidad y función de estas células estromales en el cáncer de mama, contribuyendo a potenciales enfoques terapéuticos en el futuro.

REFERENCIAS

1. Lorusso G and Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. Histochemistry and Cell Biology. 2008. 130:1091–1103. https://doi.org/10.1007/s00418-008-0530-8.
2. Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, et al. The organizing principle: Microenvironmental influences in the normal and malignant breast. Differentiation. 2002. 70:537–546. https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700907.x.
3. Raz Y, Cohen N, Shani O, et al. Bone marrow–derived fibroblasts are a functionally distinct stromal cell population in breast cancer. Journal of Experimental Medicine. 2018. 215:3075–3093. https://doi.org/10.1084/jem.20180818.
4. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. Nature. 2007. 449:557–563. https://doi.org/10.1038/nature06188.
5. Barcellos-de-souza P, Gori V, Bambi F, et al. Tumor microenvironment: Bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. BBA - Reviews on Cancer. 2013. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.10.004.
6. Giorello MB, Borzone FR, Labovsky V, et al. Cancer-Associated Fibroblasts in the Breast Tumor Microenvironment. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2021. 26:135–155. https://doi.org/10.1007/s10911-020-09475-y.
7. Labovsky V, Martinez LM, Davies KM, et al. Association Between Ligands and Receptors Related to the Progression of Early Breast Cancer in Tumor Epithelial and Stromal Cells. Clinical Breast Cancer. 2015. 15:e13–e21. https://doi.org/10.1016/j.clbc.2014.05.006.
8. Sigl V, Jones LP and Penninger JM. RANKL/RANK: from bone loss to the prevention of breast cancer. Open Biology. 2016. 6:160230. https://doi.org/10.1098/rsob.160230.
9. Kiesel L and Kohl A. Role of the RANK/RANKL pathway in breast cancer. Maturitas. 2016. 86:10–16. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.01.001.
10. Sigl V and Penninger JM. RANKL/RANK - From bone physiology to breast cancer. Cytokine and Growth Factor Reviews. 2014. 25:205–214. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.01.002.
11. Gonzalez-Suarez E, Jacob AP, Jones J, et al. RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. Nature. 2010. 468:103–107. https://doi.org/10.1038/nature09495.
12. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. Nature. 2006. 440:692–696. https://doi.org/10.1038/nature04524.

13. Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. Nature. 2010. 468:98–102. https://doi.org/10.1038/nature09387.

14. Tonini G, Imperatori M, Vincenzi B, et al. Rechallenge therapy and treatment holiday: different strategies in management of metastatic colorectal cancer. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2013. 32:92. https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-92.

15. Sigl V, Owusu-Boaitey K, Joshi PA, et al. RANKL/RANK control Brca1 mutation-driven mammary tumors. Cell Research. 2016. 26:761–774. https://doi.org/10.1038/cr.2016.69.

16. Infante M, Fabi A, Cognetti F, et al. RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling: involvement in breast cancer and clinical perspectives. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2019. 38:12. https://doi.org/10.1186/s13046-018-1001-2.

17. Schena F, Menale C, Caci E, et al. Murine Rankl−/− Mesenchymal Stromal Cells Display an Osteogenic Differentiation Defect Improved by a RANKL-Expressing Lentiviral Vector. Stem Cells. 2017. 35:1365–1377. https://doi.org/10.1002/stem.2574.

18. Chen X, Zhi X, Wang J, et al. RANKL signaling in bone marrow mesenchymal stem cells negatively regulates osteoblastic bone formation. Bone Research. 2018. 6:34. https://doi.org/10.1038/s41413-018-0035-6.

19. Park JE, Lenter MC, Zimmermann RN, et al. Fibroblast Activation Protein, a Dual Specificity Serine Protease Expressed in Reactive Human Tumor Stromal Fibroblasts. Journal of Biological Chemistry. 1999. 274:36505–36512. https://doi.org/10.1074/jbc.274.51.36505.

20. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. Protein Expression and Functional Difference of Membrane-Bound and Soluble Receptor Activator of NF-κB Ligand: Modulation of the Expression by Osteotropic Factors and Cytokines. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000. 275:768–775. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3379.

21. Hikita A, Yana I, Wakeyama H, et al. Negative Regulation of Osteoclastogenesis by Ectodomain Shedding of Receptor Activator of NF-κB Ligand. Journal of Biological Chemistry. 2006. 281:36846–36855. https://doi.org/10.1074/jbc.M606656200.

22. Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M, et al. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. Nature. 2018. 561:195–200. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0482-7.

23. Golden D, Saria EA and Hansen MF. Regulation of Osteoblast Migration Involving Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B (RANK) Signaling. Journal of Cellular Physiology. 2015. 230:2951–2960. https://doi.org/10.1002/jcp.25024.

24. Brierley JD, Gospodarowicz MK and Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 2017 (8th ed.).

25. Pestalozzi BC, Luporsi-Gely E, Jost LM, et al. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of primary breast cancer. Annals of Oncology. 2005. 16:i7–i9. https://doi.org/10.1093/annonc/mdi825.

26. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, et al. Primary breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology. 2015. 26:8–30. https://doi.org/10.1093/annonc/mdv298.

27. Wernicke M, Roitman P, Manfre D, et al. Breast cancer and the stromal factor. The "prometastatic healing process" hypothesis. Medicina. 2011. 71:15–21.

28. Bloom HJG and Richardson WW. Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer. British Journal of Cancer. 1957. 11:359–377. https://doi.org/10.1038/bjc.1957.43.

29. Martinez LM, Labovsky V, de Luján Calcagno M, et al. CD105 Expression on CD34-Negative Spindle-Shaped Stromal Cells of Primary Tumor Is an Unfavorable Prognostic Marker in Early Breast Cancer Patients. PLOS ONE. 2015. 10:e0121421. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121421.

30. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, et al. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Journal of Clinical Oncology. 2010. 28:2784–2795. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.6529.

31. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nature Methods. 2012. 9:676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.

32. Takayanagi H. RANKL as the master regulator of osteoclast differentiation. Journal of Bone and Mineral Metabolism. 2021. 39:13–18. https://doi.org/10.1007/s00774-020-01191-1.

33. Fata JE, Kong Y-Y, Li J, et al. The Osteoclast Differentiation Factor Osteoprotegerin-Ligand Is Essential for Mammary Gland Development. Cell. 2000. 103:41–50. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00103-3.

34. Kim N-S, Kim H-J, Koo B-K, et al. Receptor Activator of NF-κB Ligand Regulates the Proliferation of Mammary Epithelial Cells via Id2. Molecular and Cellular Biology. 2006. 26:1002–1013. https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.1002-1013.2006.

35. Chen G, Sircar K, Aprikian A, et al. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. Cancer. 2006. 107:289–298. https://doi.org/10.1002/cncr.21978.

36. Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, et al. Novel Aspects on RANK Ligand and Osteoprotegerin in Osteoporosis and Vascular Disease. Calcified Tissue International. 2003. 74:103–106. https://doi.org/10.1007/s00223-003-0011-y.

37. Sisay M, Mengistu G and Edessa D. The RANK/RANKL/OPG System in Tumorigenesis and Metastasis of Cancer Stem Cell: Potential Therapeutic Targets for Anticancer Therapy. Journal of Cancer Science & Therapy. 2017. 09:3801–3810. https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000451.

38. Tsubaki M, Takeda T, Yoshizumi M, et al. RANK-RANKL interactions are involved in cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma cell lines. Tumor Biology. 2016. 37:9099–9110. https://doi.org/10.1007/s13277-015-4761-8.

39. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. Nature. 2007. 449:557–563. https://doi.org/10.1038/nature06188.

40. Raz Y, Cohen N, Shani O, et al. Bone marrow–derived fibroblasts are a functionally distinct stromal cell population in breast cancer. Journal of Experimental Medicine. 2018. 215:3075–3093. https://doi.org/10.1084/jem.20180818.

41. Christofori G. New signals from the invasive front. Nature. 2006. 441:444–450. https://doi.org/10.1038/nature04872.

42. Macedo F, Ladeira K, Pinho F, et al. Bone metastases: an overview. Oncology Reviews. 2017. https://doi.org/10.4081/oncol.2017.321.

43. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer metastasis reviews. 1989. 8:98–101. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2673568.

44. Blake ML, Tometsko M, Miller R, et al. RANK expression on breast cancer cells promotes skeletal metastasis. Clinical & Experimental Metastasis. 2014. 31:233–245. https://doi.org/10.1007/s10585-013-9624-3.

45. Palafox M, Ferrer I, Pellegrini P, et al. RANK induces epithelial-mesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis. Cancer Research. 2012. 72:2879–2888. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0044.

ABSTRACT

The molecular system, composed of the receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) and its ligand (RANKL), plays a fundamental role in a wide variety of physiological and pathological processes. These processes include the regulation of bone metabolism, mammary gland development, and immune function, as well as their involvement in tumorigenesis and the metastasis of tumor stem cells. However, little is known about their specific function in the mammary tumor microenvironment. In this study, we investigated the importance of RANK expression in tumor-associated fibroblasts (CAFs) as a potential prognostic biomarker in early-stage (I/II) infiltrating ductal breast cancer patients. Our results show that high RANK expression in these cells is significantly correlated with an increased risk of metastasis, a shorter metastasis-free survival time, and lower overall survival in these patients. Additionally, when analyzing CAFs CD34(-), isolated from primary tumors in breast cancer patients (PCM), we observed co-expression of RANK with the CD105 marker, characteristic of mesenchymal stromal cells (MSCs), suggesting the possible cellular origin of the studied CAFs. Furthermore, we found that RANK plays a crucial role in the migration of these stromal cells in the mammary tumor microenvironment. Collectively, these results support the clinical relevance of RANK in CAFs and propose its potential as a future therapeutic target in the treatment of early-stage breast cancer. These findings are especially significant given the need for more accurate prognostic biomarkers to prevent metastasis occurrence in early-stage PCM.

Palabras clave: RANK, cáncer de mama, metástasis, factor pronóstico, fibroblastos asociados al tumor, células estromales mesenquimales

DESARROLLO DE MÉTODO DE DETECCIÓN DE *MYCOPLASMA GENITALIUM* Y ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS DE LA INFECCIÓN EN PACIENTES FEMENINOS

Patricia Kunda, Jessica Mosmann, Andrea Salas, Noelia Lujea, Ximena Kiguen, E. López Asencio, Camila Oyarzabal, Luciano Ganzer, José Sad Larcher, Cecilia Cuffini

Centro de Investigaciones en Medicina Traslacional - CIMETSA, del Instituto Universitario de Ciencias Biomédicas de Córdoba - IUCBC

INTRODUCION

Las enfermedades del cuello uterino femenino, como la vaginosis bacteriana, tienen una alta prevalencia mundial y una costosa carga económica (Peebles 2019, Barrow 2020). Por lo tanto, las investigaciones dirigidas a determinar la etiología de estas enfermedades y la generación de estrategias de prevención y tratamiento son de suma importancia para reducir la tasa de infecciones en la mujer, las consecuencias de la infección y los costos de salud pública.

Entre los microorganismos de transmisión sexual, *Mycoplasma genitalium* (MG) ha sido propuesto como agente causal de enfermedades de transmisión sexual emergentes (Zúñiga Carrasco y Lozano, 2018). La MG es difícil de cultivar, por lo que su detección en casos clínicos ha sido bastante reciente, con el desarrollo de técnicas moleculares. Por lo tanto, en la actualidad, en relación con otros agentes infecciosos, poco se conoce sobre la incidencia, filogenia y factores que facilitan la colonización y patogenicidad. Según el laboratorio del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud SNVS 2.0, en Argentina la positividad de MG ha ido en aumento, pasando de 2,2% en 2018 a 2,3% en 2019. Entre todas las muestras, personas de 45 a 64 años fueron las que presentaron los niveles más altos de positividad, reportando alrededor de 5,4% en 2019 (SNVS, Boletín 37, 2020).

Es importante destacar que las infecciones por MG se han relacionado directamente con patologías endocervicales. Más recientemente, la confección MG se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer de cuello uterino (Klein 2020). Además de esto, el MG desarrolla resistencia a los antibióticos si la infección no se trata adecuadamente (Hilmarsdóttir 2020; van der Schalk 2020). Las guías más recientes recomiendan la azitromicina como tratamiento de primera línea (Sethi 2017). Este antibiótico se usa comúnmente para tratar infecciones por transmisión sexual (ITS). Por otro lado, se ha reportado una alta tasa de resistencia a Azitromicina en varios países (Fernández-Huerta 2019). En Argentina, el Laboratorio de Referencia de ITS reportó un incremento en la propagación de la resistencia a la Azitromicina en seis jurisdicciones del país, incluidas BsAs y Córdoba (SNVS, Boletín 37, 2020). Estos hechos enfatizan la necesidad de un estudio epidemiológico y el análisis de la asociación de MG con otros microorganismos de trasmisión sexual, como *Chlamydia tracomatis* (CT) o *Ureaplasma urealyticum* (UU). Esta información podría ayudar a implementar estrategias de tratamiento dirigidas a casos

particulares de infección/co-infección evitando la resistencia en otros patógenos del tracto urogenital (Treviño 2021).

En adición a lo anterior, las investigaciones destinadas a conocer la incidencia de ITS en determinadas poblaciones, son múltiples. Sin embargo, en la mayoría de las investigaciones no se valora el conocimiento de la población. El control efectivo de las ITS emergentes, requiere respuestas de salud específicas y multimodales que incluyen la promoción de la salud y la prevención biomédica, con el compromiso y la participación activa de la comunidad. Por todo lo anteriormente dicho, creemos que es sumamente importante generar programas de difusión adaptados a los distintos sectores de la sociedad en Córdoba (ejemplo, adolescentes, adultos mayores, géneros etc) para informar a la población sobre MG. Mientras mucho se conoce sobre el Virus del Papiloma Humano (HPV), el MG aún es poco conocido por la población general e incluso en la población biomédica.

Por lo tanto, planteamos como objetivos del proyecto:

Objetivo General:

Ganar conocimientos sobre la etiopatogenia de MG a los fines de mejorar el diagnóstico, elección de tratamiento y prevención.

Objetivos específicos:

1. Desarrollar la metodología basada en PCR para la detección específica de MG y.
2. Investigar la incidencia de infección y coinfección por MG, UU y CT en una población de mujeres cordobesas.
3. Indagar el estado de conocimiento de la población, discriminando edad, formación académica, etc., a los fines de generar proyectos de difusión y educación sobre MG adaptados a las necesidades actuales de la comunidad.

METODOLOGIA

Muestras humanas.

La recolección de muestras humanas se llevó a cabo de acuerdo con el Código de Ética de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki). Las muestras se obtuvieron de pacientes adultas del sexo femenino de la consulta de ginecología del Hospital Privado Universitario de Córdoba (REPIS 3459). Obtuvimos el consentimiento informado de los pacientes. El estudio retrospectivo se llevó a cabo utilizando muestras del laboratorio del Dr. Cuffini. El estudio retrospectivo fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Privado Universitario de Córdoba.

Criterios de inclusión: todas aquellas pacientes adultas que hayan firmado consentimiento informado de edad mínima 18 años.

Criterios de exclusión: Todas las pacientes femeninas que no cumplen con los criterios de inclusión y pacientes embarazadas e inmunocomprometidas.

ADN genómico y PCR.

El ADN genómico bacteriano se extrajo utilizando el kit de extracción de ADN genómico Accuprep (BIONEER) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Cebadores: se usaron pares de cebadores de las secuencias de la proteína ribosomal 16S (de la cepa G-37 (número de acceso X77334)) para detectar MG, según el trabajo de Jurstrand et al (Jurstrand 2005). Para evitar falsos negativos por inhibición de la PCR, utilizamos un plásmido con una secuencia de mycoplasma y su par de cebadores específicos. El plásmido fue proporcionado generosamente por el Dr. Cord Uphoff (Uphoff 2014). Además, se detectó el gen de la GAPDH humana. Como control positivo también contamos con material genético purificado de una muestra positiva para MG, generosamente donada por la Dra. Galarza (Instituto Malbran, Buenos Aires). Además, se detectó UU utilizando un par de cebadores específicos para 16S de UU (Uphoff 2014). La detección de CT se realizó en el laboratorio de la Dra Cuffini, InVIV-FCM-UNC con procedimientos estandarizados en el laboratorio.

Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron mediante Chi-cuadrado, prueba t y prueba exacta de Fisher con un nivel de significación del 5 % (IC del 95 %). Todas las pruebas se realizaron con Prism 5 (software GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.).

Encuesta anónima.

Se realizó un estudio cuantitativo, observacional, de corte transversal y prospectivo. Se utilizó una encuesta propia, estructurada, anónima y autoadministrada mediante Google Forms (agosto a octubre de 2022). Su distribución a la comunidad se realizó de diversas maneras: por contactos y mediante afiches de difusión con acceso con código QR. Estuvo destinado a la población en general.

RESULTADOS

Análisis de la incidencia y confección de MG, UU y CT.

El análisis cuantitativo de la presencia de los tres microorganismos revelo que la infección por MG fue del 6,7%, la UU del 49,1% y la CT del 48,1% (Figura 1).

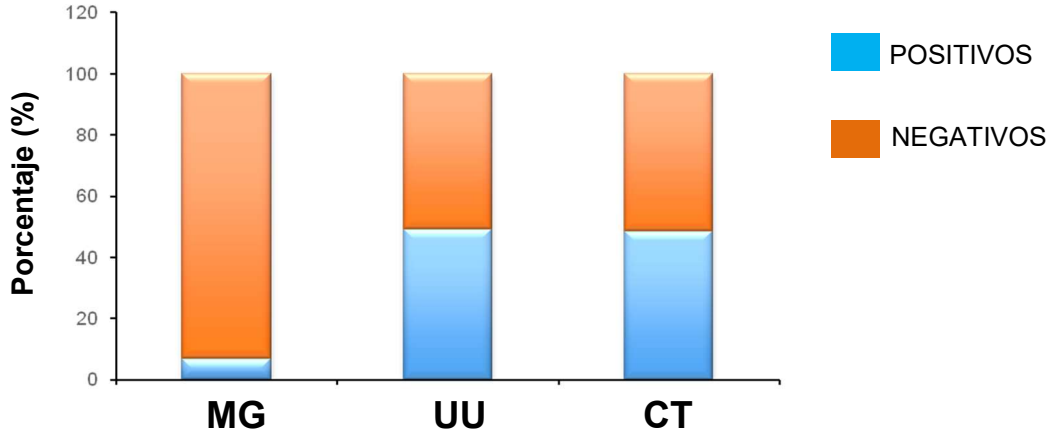


Figura 1: Porcentaje de casos positivos (azul) y negativos (naranja) de MG, UU y CT.

La prevalencia global de coinfección por los 3 microorganismos fue del 2,7%. Se encontró que la infección por MG estaba asociada con CT (intervalo de confianza del 95 % = 1,61 a infinito, p <0,05) y UU (intervalo de confianza del 95 % = 1,48 a infinito, p <0,05), mostrando también una correlación significativa tanto con CT como con UU (r2=0,030; p<0,05 para CT; r2=0,027; p<0,05 para UU). Sin embargo, la infección UU no se asoció con CT y viceversa (Figura 2).

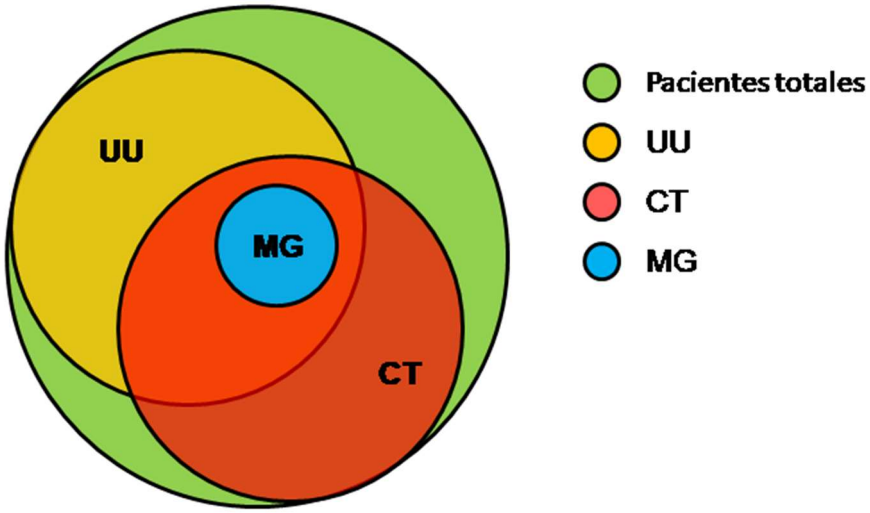


Figura 2: Representación gráfica del porcentaje de infección y coinfección de MG (azul), UU (amarillo), CT (naranja). La coninfección se representa con la superposición de los círculos. De las muestras analizadas (verde), el 6,7% fueron positivas para MG, el 49,1% para UU y el 48,4% CT.

La incidencia de MG y UU aumenta con la edad de la paciente.

Los análisis de las edades de los pacientes revelaron que la incidencia de MG fue del 25 % para pacientes entre 20 y 29 años, 25 % entre 30 y 49 años y 31 % entre 40 y 45 años (Tabla 1).

Edades (años)	MG %	UU %
20-29	25	25
30-39	25	30
40-49	31	61

Tabla1: Análisis de porcentaje de casos positivos para MG y UU en los distintos rangos etarios.

El análisis de los datos clínicos de los pacientes de consulta para la evaluación reproductiva no reveló una asociación directa con MG en aquellos pacientes con antecedentes de aborto recurrente o infertilidad. Nuestro estudio sugiere que habría una mayor incidencia en mujeres mayores de 40 años. Además, nuestros datos generales

sugieren que la presencia de MG puede tener un valor predictivo para la coinfección con otros patógenos, aunque queda por dilucidar la importancia clínica de la asociación entre la MG, la CT y la infección por UU.

Análisis de datos del cuestionario sobre el conocimiento de la población sobre HPV y MG.

Para identificar el conocimiento de la población argentina sobre MG, se realizó una encuesta propia, estructurada, anónima y autoadministrada mediante *Google Forms* (agosto a octubre de 2022). Este trabajo fue parte de pasantías de investigación de los estudiantes de Medicina del IUCBC: María López Asensio, Josefina Villada Guerra, Camila Victoria Montes Salica.

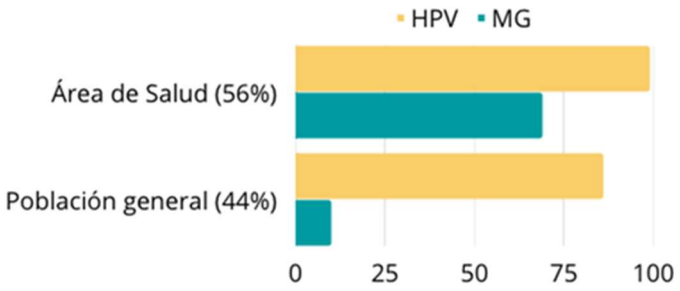


Figura 3: Porcentaje de personas que conocen sobre HPV (amarillo) y MG (verde). Arriba se encuentra las respuestas positivas de las personas del área de salud. Abajo se encuentran los resultados de la población en general.

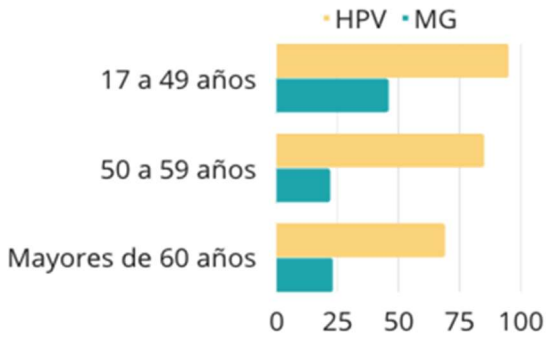


Figura 4: Conocimiento sobre HPV (amarillo) y MG (verde) según grupo etario.

De un total de 419 encuestados, el 40% no ha escuchado hablar sobre MG. Los resultados muestran que casi el 100% de los encuestados del área de la salud conocen sobre el HPV. Sin embargo, el 56% de los mismos conoce el MG (Figura 3). Mientras que la población en general, si bien el 80% conoce sobre el HPV, menos del 10% ha sentido nombrar el MG.

En relación a las edades, el participante más joven contaba con 17 años al momento de la encuesta y el adulto mayor contaba con mayor 72 años de edad. Respecto a la distribución de las edades por rangos, la población joven y adultos jóvenes tienen una mayor proporción de conocimientos sobre el MG que la población adulta (50-59 años) y adulta mayor (mayores a 60 años) (Figura 4). Estos datos reflejan que MG ha tenido la mayor difusión y ha sido implementado en los planes educativos más recientemente.

El 35% de los trabajadores y estudiantes del área de la salud conoce su diagnóstico y tratamiento. De aquellos que no pertenecen al ámbito sanitario, el 89,6% no conoce al microorganismo.

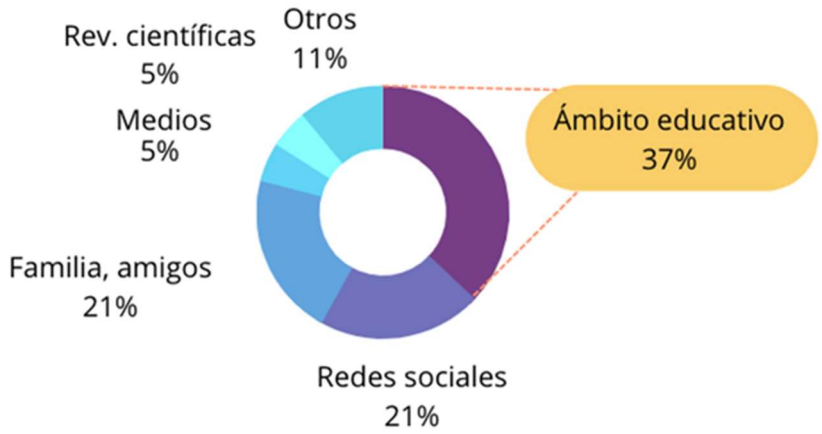


Figura 5: representación gráfica de las formas de adquisición de la información sobre MG.

En cuanto a la forma de adquisición del conocimiento de aquellas personas que conocen sobre el MG, el ámbito educativo ha tenido el mayor porcentaje (37%). Le siguen las redes sociales y familia o amigos (21%). En menor proporción, se encuentran los medios de difusión masivo (5%). Estos resultados muestran que el ámbito académico es el principal medio de información para las ITS. Estos resultados indican que sería necesario implementar medidas de educación y difusión a la población general, por medios masivos de difusión.

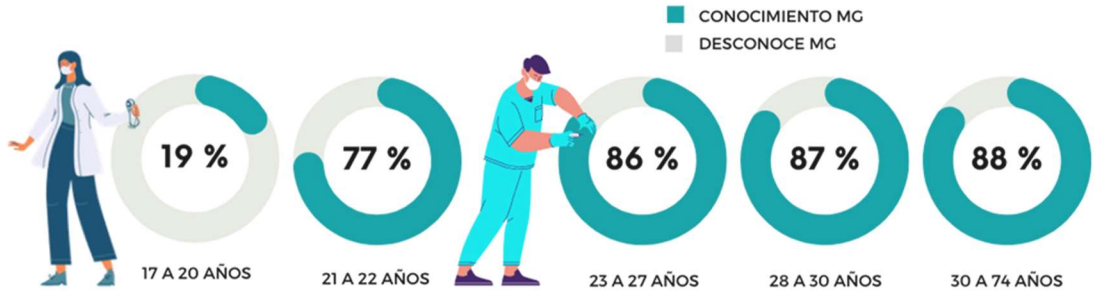


Figura 6: Conocimiento de MG de estudiantes de Medicina y profesionales de la salud.

Para conocer en qué etapa de formación de los profesionales de la salud esta afianzado el conocimiento del MG, se analizaron los porcentajes en relación a la distribución por edades según el rango etario. Los resultados muestran que aquellos individuos jóvenes (17-20 años) solo el 19% conoce sobre el MG. Mientras que el mayor porcentaje de conocimiento ocurre en los profesionales/estudiantes entre los 21 a 27 años. Esta composición etaria coincide con el rango de asistencia a las instituciones educativa de la salud (ejemplo carrera de medicina, enfermería, etc) (Figura 6).

CONCLUSIÓN

Este trabajo sugiere que MG podría tener un valor predictivo para la coinfección con otros patógenos, aunque la importancia clínica de la queda por dilucidar la asociación entre la infección por MG, CT y UU.

El análisis del conocimiento de la población sobre MG, refleja, por un lado, la necesidad de generar campañas de difusión en la población general y por otro, reforzar las temáticas educativas en los profesionales de la salud.

Este trabajo sugiere que es necesario darle a Mycoplasma genitalium un lugar más relevante en la formación de profesionales sanitarios. Además, resulta prioritario generar campañas de difusión destinadas a la comunidad en general.

REFERENCIAS

- Barrow R; Ahmed F, Bolan G, Workowski K. Morbidity and Mortality Weekly Report. Recom and Reports. 2020.68(5);1–20.
- Fernández-Huerta M, Serra-Pladevall J, Barberá MJ, Espasa. Mycoplasma genitalium and antibiotic resistance in Spain; the need for an effective response against an emerging problem. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019; 37(2):144-145.
- Hilmarsdóttir I, Arnardóttir EM, Jóhannesdóttir ER, Valsdóttir F, Golparian D, Hadad R, Vigfússon HB, Unemo M. Prevalence of Mycoplasma genitalium and Antibiotic Resistance-Associated Mutations in Patients at a Sexually Transmitted Infection Clinic in Iceland, and Comparison of the S-DiaMGTV and Aptima Mycoplasma genitalium Assays for Diagnosis. J Clin Microbiol. 2020. 58(9):e01084-20
- Jurstrand M, Jensen JS, Fredlund H, Falk L, Mölling P. Detection of Mycoplasma genitalium in urogenital specimens by real-time PCR and by conventional PCR assay. J Med Microbiol. 2005. 54(Pt 1):23-9.
- Klein C, Samwel K, Kahesa C, Mwaiselage J, West, Wood C and Angeletti P, Mycoplasma Co-Infection Is Associated with Cervical Cancer Risk. Cancers. 2020. 12, 1093.
- Peebles K, Velloza, J Balkus J, McClelland R, Barnabas R. High Global Burden and Costs of Bacterial Vaginosis: A Systematic Review and Meta-Analysis Sex Transm Dis. 2019; 46(5):304-311.
- Sethi S, Zaman K, Jain N. (2017)Mycoplasma genitalium infections: current treatment options and resistance issues Infection and Drug Resistance. 2017:10 283–292
- Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud SNVS 2.0, Boletín Nº 37. Respuesta al VIH y las ITS en la Argentina Dirección de Respuesta al VIH, ITS, Hepatitis 2020. Recuperado de https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-sobre-el-vih-sida-e-its-en-la-argentina-ndeg-37.
- Treviño M, Rodríguez-Velasco M, Manso T, and Cea M.. Mycoplasma genitalium en Atención Primaria: Prevalencia y resistencia a azitromicina en el Área Sanitaria de Santiago de Compostela. Rev Esp Quimioter 2021; 34(5): 496–499.

- Uphoff CC and Drexler HG. Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures. Currt Prot in Mol Biol. 2014. 28(4):1-28.
- van der Schalk, J.F. Braam and J.G. Kusters . Inte of Antimicrobial Agent. 2020. 55 . 105911..
- Zúñiga Carrasco I y Lozano J. Mycoplasma genitalium: un patógeno emergente de transmisión sexual. Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica. 2018. 31, 4:149-151.

ABSTRACT

Infection by sexually transmitted microorganisms has been associated with vaginitis, spontaneous abortions, urethritis, infertility, etc. We investigate the incidence of infection and coinfection for *Mycoplasma genitalium* (MG), *Ureaplasma urealyticum* (UU) and *Chlamydia trachomatis* (CT) in a population of women in Cordoba. The project has the approval from the HPUC CIEIS and it was approved by the Research and Teaching Committee from the HPUC for the retrospective samples analysis. A total of 323 samples of adult female patients from different health centers in the province of Córdoba were analyzed. Genomic DNA was extracted from cervical swabs and the detection of the three microorganisms was determined by PCR according to standardized protocols. MG infection was 6.7%, UU was 49.1% and CT 48.1%. The overall prevalence of coinfection with the 3 microorganisms was 2.7%. MG infection was found to be associated with CT (95% confidence interval= 1.61 to Infinity, $p<0.05$) and UU (95% confidence interval = 1.48 to Infinity, $p<0.05$), showing also a significant correlation with both CT and UU ($r2=0.030$ p $p<0.05$ for CT; $r2=0.027$ p $p<0.05$ for UU). However, UU infection did not associate with CT and vice verse. Analyses of the patient's ages revealed that MG incidence was 25% for patients between 20-29 years old, 25% between 30-49 years and 31% between 40-45 years of age. Examination of clinical data from consultation patients for reproductive evaluation, revealed no direct association with MG in those patients with a record of recurrent abortion or infertility. Our study suggests that there would be a higher incidence in women over 40 years of age. Also, our overall data suggest that MG may have a predictive value for coinfection with other pathogens although the clinical significance of the association between MG, CT and UU infection remains to be elucidated.

ANEXO

Presentaciones a Congresos:

- Congreso Argentino de Educación Médica (CAEM). 20-22 septiembre 2023. Experiencia extensionista de Medicina: ¿Qué sabemos de Mycoplasma genitalium?. Villada Guerra J, López Asensio ME, Montes Salica CM, Mosmann J, Ganzer L, Salas AV, Torres AL, Kunda PE.
- III Jornadas Avances en Medicina Traslacional IUCBC 2022. VI Jornadas de investigación intrahospitalarias del HPUC. 14 noviembre 2022. ¿Que sabemos de Mycoplasma genitalium? María López Asensio, Josefina Villada Guerra, Camila Victoria Montes Salica, Jessica Mosmann, Noelia Lujea, Luciano Ganzer, Andrea Salas, Ana Lia Torres, Patricia Elena Kunda. Poster y presentación oral.

- SAIB-SAMIGE. 1-5 noviembre de 2021. Incidence of Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealyticum and Chlamydia trachomatis in a population of women in Cordoba. Mosman J Lujea N, Kiguen X, Lopez Asensio E, Oyarzabal Dadone C, Ganzer L, Sad Larcher J, Cuffini C, Kunda P. Poster.
- Congreso LVII SAIB, noviembre 2021. Incidence of *Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia trachomatis* in a population of women in Cordoba. Mosmann J, Lujea N, Kiguen X, Lopez Asencio E, Oyarzabal C, Ganzer L, Larcher J, Cuffini C, Kunda P.
- II Jornadas Científicas de Avances en Medicina Traslacional – IUCBC y en las V Jornadas de Investigación Intrahospitalarias del Hospital Privado Universitario de Córdoba. 25 y 26 de noviembre 2021. Mycoplasma genitalium: un microorganismo de trasmisión sexual de investigación emergente. Kunda P. Publicado en muro virtual.
- LV SAIB Salta, Argentina. Noviembre 2019. Estudio de la prevalencia de Mycoplasma genitalium en una población de mujeres en Córdoba. Masner M, Kiguen X, Lujea N, Ganzer L, Larcher J, Cuffini C, Kunda P. Poster.
- XXIII Jornada de la Sociedad de Biología de Córdoba en agosto 2019. Masner M, Ganzer L, Kiguen X, Lujea N, Larcher J, Cuffini C, Kunda P**.** La mycoplasmosis entre nosotros.

Publicaciones:

1. Incidence of *Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia trachomatis* in a population of women in Cordoba-Argetnine. Mosmann J, Kiguen X, Salas A, Ganzer L, Larcher J, Cuffini C, Kunda P. En preparación.
2. Study of the prevalence of *Mycoplasma genitalium* in a women's population in Cordoba. Masner M, Kiguen X, Lujea N, Ganzer L, Larcher J, Cuffini C, Kunda P. BIOCELL 43 (suppl.5), 2019 ISSN 1667-5746 (online version).
3. Incidence of *Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia trachomatis* in a population of women in Cordoba. Mosmann J, Lujea N, Kiguen X, Lopez Asencio E, Oyarzabal C, Ganzer L, Larcher J, Cuffini C, Kunda P. BIOCELL 46 (Suppl. 1), 2022. ISSN 0327- 9545 (printed version). ISSN 1667-5746 (online version).

Extensión a la comunidad:

- Cuestionario Virtual dirigido a la comunidad de Córdoba. Proyecto titulado: ¿Que sabemos de *Mycoplasma genitalium*? mayo a septiembre 2022. Resolución rectoral IUCBC: RR 109/22.
- Jornada Virtual Titulo del Proyecto: Lo que la "Investigación en Medicina Traslacional" nos enseña sobre enfermedades infecciosas. 11 mayo 2022. Dirigido a estudiantes de 5to y 6to año de secundario de distintas instituciones públicas y privadas de la Provincia de Córdoba. Resolución rectoral IUCBC: RR 103/22.
- Jornada Virtual Titulo del Proyecto: De la Medicina Traslacional al aula. Lo que la "Investigación en Medicina Traslacional" nos enseña sobre enfermedades infecciosas. 29 de octubre 2021. Dirigido a estudiantes de 5to y 6to año de secundario de distintas instituciones públicas de la ciudad de Córdoba. Resolución rectoral IUCBC: RR 139/21.

RELEVANCIA PRONÓSTICA DEL MICROBIOMA EN EL TEJIDO TUMORAL DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Vivian Labovsky [1], Leonardo Dandeu [1], Alberto Penas-Steinhardt [2], Pablo Aguilera [2], Pablo Marenco [1], María del Pilar Carballo [2], María Fernanda Alsina [3], Martín P. Vázquez [3], Alejandra Wernicke [3], Norma A. Chasseing [1]

[1] Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME - CONICET.
[2] Universidad Nacional de Luján. [3] Departamento de Patología, Hospital Italiano de Buenos Aires. [4] Instituto de Oncología Ángel H. Roffo.
[5] Instituto Héritas, CIBIC - INDEAR

INTRODUCCIÓN

1.1. Breve introducción al cáncer.

El cáncer es la segunda causa más frecuente de muerte en los Estados Unidos, después de las enfermedades cardiovasculares. Además de su alta mortalidad, el sufrimiento emocional y físico que producen las neoplasias hace que tanto los pacientes como la sociedad en general se pregunten cuándo se logrará conseguir una cura. La respuesta a esta tan sencilla pregunta, a menudo resulta complicada, ya que el cáncer no es una sola enfermedad, sino más bien un conjunto de muchas enfermedades caracterizadas por una grave desregulación del crecimiento o replicación celular (Robbins, 2018).

Como punto de partida, es importante postular las características fundamentales y comunes a todos los cánceres:

1. Es un trastorno genético causado por mutaciones en el ADN. La mayoría de las mutaciones se inducen por exposición a mutágenos o se producen de forma espontánea por el envejecimiento.
2. Las alteraciones genéticas en las células cancerosas son hereditarias, pasando a las células hijas durante la división celular. Lo interesante sobre este punto es que las células sufren selección darwiniana, es decir, sobrevive la más dotada que en términos biológicos será aquella más apta para el desarrollo, crecimiento y supervivencia. En consecuencia, estas ventajas que poseen esas células se van heredando y así se forman los tumores clonales (descienden de una sola célula).
3. Las diferentes mutaciones tanto genéticas como epigenéticas les dan a las células cancerosas, determinadas propiedades únicas del tipo de cáncer. Estas mismas propiedades les confieren sus características fenotípicas, que ayudan al entendimiento de la evolución natural que tendrá el mismo cuando es diagnosticado, así como su respuesta a diferentes tratamientos. (Robbins, 2018).

La incidencia del cáncer varía con la edad, los factores geográficos y la genética. Hasta hace no muchos años, se creía que la variación geográfica implicada se debía mayormente a las exposiciones ambientales, pero, los avances científicos, nos permitieron entender que hay otros factores que promueven el desarrollo maligno de los tumores o, por el contrario, protegen y benefician.

1.2. Cáncer de mama.

Definido como un cúmulo de células mamarias que comienza a crecer de forma descontrolada, el cáncer de mama es el más comúnmente diagnosticado y la mayor causa de muerte para las mujeres (World Health Organization, n.d.).

Alrededor de la mitad de los casos de cáncer de mama corresponden a mujeres sin ningún factor de riesgo identificable, a excepción del género femenino y en la edad mayor a 40 años. Algunos factores aumentan el riesgo de padecer esa enfermedad, como son el envejecimiento, la obesidad, el consumo perjudicial de alcohol, los antecedentes familiares de cáncer de mama, el historial de exposición a radiación, el historial reproductivo (como la edad de inicio de los períodos menstruales y la edad al primer embarazo), el consumo de tabaco y la terapia hormonal posterior a la menopausia. (World Health Organization, n.d.).

Contrario a lo que popularmente se cree, la mayoría de las mujeres que son diagnosticadas con cáncer de mama, no tienen antecedentes familiares conocidos de la misma enfermedad. Por eso, no necesariamente la falta de estos antecedentes indica que una mujer esté menos expuesta a desarrollarlo (Breastcancer.Org, n.d.).

Según un estudio publicado en 2018, para el cual se utilizó la base de datos de GLOBOCAN, este tipo de tumor fue la principal causa de muerte entre las mujeres en el mundo, seguido del cáncer colorrectal y el cáncer de pulmón (en incidencia y viceversa en mortalidad) (Bray et al., 2018). En 2020, según la Organización Mundial de la Salud, alrededor de 685.000 mujeres fallecieron como consecuencia de esta enfermedad.

La mayoría de los casos y de las muertes por esta enfermedad se registran en países de ingresos bajos y medianos. Registros de la Organización Panamericana de la salud, indican que la Argentina ocupa el segundo puesto en riesgo de muerte por cáncer mamario en América Latina: “mueren alrededor de 20 mujeres por día a causa de esta enfermedad y las estadísticas indican que, al llegar a los 85 años, una de cada ocho la habrá sufrido.” (Sociedad Argentina de Mastología, n.d.).

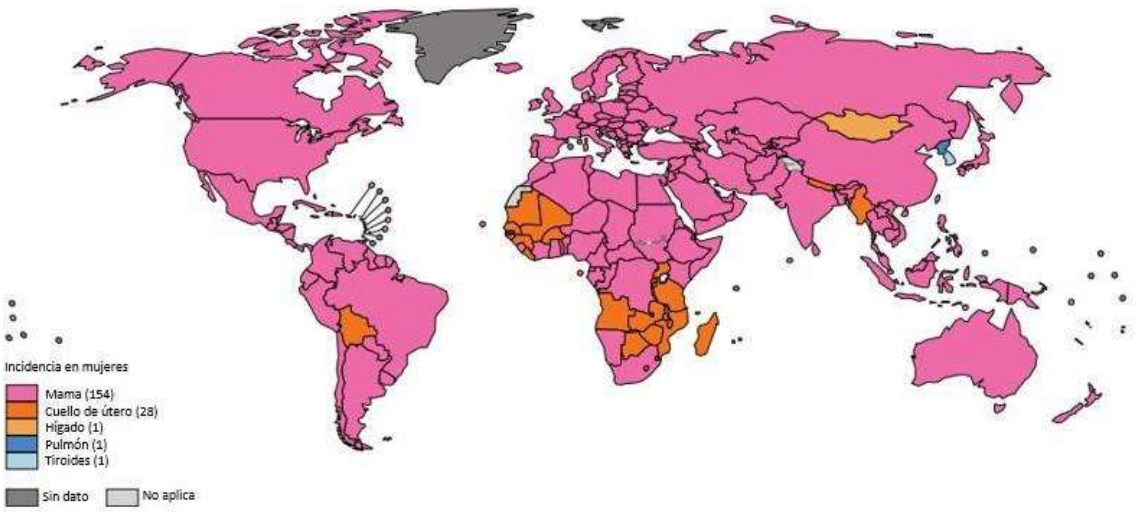


Figura 1: Mapa Global que representa la incidencia en mujeres, de los tipos más comunes de cáncer en cada país, año 2018. (Imagen adaptada de Bray et al., 2018).

1.3. Clasificación molecular del cáncer de mama.

Siendo una enfermedad muy heterogénea, el cáncer de mama incluye varias entidades clínicas, morfológicas y moleculares distintas. Las principales variables clínicas, (edad, tamaño tumoral, afección ganglionar y grado histológico) y biomarcadores (receptor de estrógeno, receptor de progesterona y HER2) comúnmente utilizados en la práctica clínica para estratificar a los pacientes por su riesgo de recaída y seleccionar sus tratamientos, no explican completamente la complejidad biológica del cáncer de mama.
Durante las últimas décadas se constató de forma más patente la gran variabilidad biológica de la patología, al haberse profundizado en el análisis de su maquinaria molecular. Esta caracterización se pudo llevar a cabo gracias a técnicas sofisticadas que se han puesto a disposición de los profesionales como los *microarrays* de expresión génica.

Se llegó a esta clasificación a partir del análisis de cDNA de 38 cánceres de mama (36 ductales infiltrantes y 2 carcinomas lobulillares), 1 carcinoma ductal *in situ*, 1 fibroadenoma y 3 muestras de mama normal, así como también muestras repetidas de las mismas pacientes. *Perou y col* definieron una lista de genes intrínsecos, aquellos cuya expresión difiere en gran medida entre tumores de diferentes pacientes en comparación con las muestras repetidas de la misma muestra.

La evaluación cuantitativa de múltiples genes, en lugar del estudio histopatológico subjetivo de varias características del tumor, ofrece una caracterización más precisa de la biología del tumor que permite, además, predecir con mayor certeza el comportamiento clínico del cáncer de mama y, posiblemente también su respuesta al tratamiento (Díaz-Faes, n.d.).

Se han identificado cuatro principales subtipos moleculares "intrínsecos" de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, HER2-*enriched* y Basal-*like*. Más recientemente, se describieron nuevos grupos moleculares llamados "*Claudin-low*" (RE-negativos) con propiedades biológicas similares a las de las células madre cancerosas y con un pronóstico malo. Estos grupos moleculares presentan diferencias en su incidencia, pronóstico y respuesta a tratamientos (**Tabla I**).

TABLA I: Características de los subtipos moleculares de cáncer de mama.

Subtipo Molecular	Frecuencia	RE/RPg HER2	CK5/6 EGFR	Genes de Proliferación	Genes Característicos	Grado Histológico	Mutaciones de TP53	Pronóstico
Basal-like	8-20%	RE- RPg- HER2-	+	Alto	*KRT5, CDH3, ID4, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2*	Alto	Alto	Malo
HER2-enriched	10-15%	RE- RPG- HER2+	+/-	Alto	*ERBB2, GRB7*	Alto	Alto	Malo
Normal breast-like	6-10%	RE-/+ HER2-	+	Bajo	*PTN, CD36, FABP4, AQP7, ITGA7*	Bajo	Bajo	Intermedio
Luminal A	55-60%	RE+ RPg+ HER2-	-	Bajo	*ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1*	Bajo	Bajo	Excelente
Luminal B	10-15%	RE+/- RPg+/- HER2-/+	-	Alto	*ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM4B*	Intermedio/ Alto	Intermedio	Intermedio/ Malo
Claudin-low	5%	RE- RPg- HER2-	+/-	Alto	*CD44, SNAI3*	Alto	Alto	Malo

Fuente: (Díaz-Faes, n.d.)

Estos perfiles moleculares constituyen un complemento para los métodos diagnósticos convencionales, como también han contribuido a un mejor entendimiento de la biología de estos tumores, a un cambio en el diseño de los ensayos clínicos y también a la toma de decisiones a la hora de postular tratamientos para diversos pacientes.

Acorde al avance de la tecnología, será inminente el surgimiento de nuevas subcategorías del cáncer de mama, lo cual abrirá nuevos caminos en la investigación de esta enfermedad.

1.4. Tipos de cáncer de mama.

Hay muchos tipos de cáncer de mama y varias formas de describirlos, pero la realidad es que el tipo específico de células afectadas determina el tipo de cáncer a la hora de diagnosticar.

La gran mayoría de tumores de seno son *carcinomas* que se originan en células epiteliales. Si los carcinomas tienen origen en la mama por lo general, son de un tipo más específico llamado adenocarcinoma, que comienza en las células de los conductos o los lobulillos.
El tipo de cáncer también puede referirse a la propagación, por ejemplo, el cáncer de seno in situ, también conocido como carcinoma ductal in situ o DCIS, comienza en un conducto de leche, pero no se ha propagado en el resto del tejido mamario. El cáncer de seno invasivo, o también conocido como infiltrante es cualquier tipo de tumor maligno

que se haya propagado al tejido mamario de alrededor (American Cancer Society, n.d.). Estos últimos mencionados son los más comunes siendo el carcinoma ductal invasivo representante de aproximadamente el 70% a 80% de la totalidad de los cánceres de mama (American Cancer Society, n.d.).

1.5. Factores de riesgo.

El cáncer de mama se desarrolla debido a la interacción de múltiples factores de riesgo. Presenta una mayor incidencia en mujeres mayores de 50 años, aunque aproximadamente un 10% de los casos se diagnostican en mujeres menores de 40 años.

El estadio en el que se diagnostica el cáncer tiene un impacto significativo en la supervivencia del individuo. La tasa de supervivencia en el estadio I supera el 98%, mientras que en los estadios IV la supervivencia disminuye al 24%.

Aunque aún no se han esclarecido las causas exactas del desarrollo de esta enfermedad, se han identificado numerosos factores de riesgo asociados a ella. Gran parte, están relacionados con antecedentes reproductivos que influyen en la exposición hormonal a lo largo de la vida.

Los factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama incluyen:

- Edad: el riesgo aumenta con la edad.
- Historia personal de cáncer de mama invasivo, carcinoma ductal in situ o carcinoma lobulillar in situ.
- Historia de hiperplasia atípica.
- Densidad mamaria elevada en las mamografías.
- Factores reproductivos que prolongan la exposición a los estrógenos endógenos, como la primera menstruación temprana, la menopausia tardía o la nuliparidad (no haber tenido hijos).
- Uso de terapia hormonal sustitutiva después de la menopausia, especialmente combinando estrógeno y progesterona.
- Exposición a radiaciones ionizantes, especialmente durante la pubertad.
- Mutaciones genéticas hereditarias relacionadas con el cáncer de mama.
- Consumo de alcohol.
- Obesidad.
- Antecedentes familiares de cáncer de mama o presencia de mutaciones genéticas específicas.

Es importante destacar que la presencia de estos factores de riesgo no garantiza el desarrollo de la enfermedad, pero sí aumenta la probabilidad de padecer cáncer de mama. Además, cada caso es único y otros factores individuales pueden influir en el riesgo y desarrollo de la enfermedad.

Por otro lado, la experiencia y la investigación, hoy en día, ha demostrado que algunos factores relacionados al estilo de vida de las mujeres, las protegen del desarrollo del cáncer de seno. Cursar un embarazo a término antes de los 20 años o, tener múltiples partos y la lactancia fueron algunos de los factores observados en la mayoría de los grupos étnicos y en mujeres con mutaciones de BRCA1 o BRCA2. Sin embargo, en mujeres cuyo cáncer de mama se diagnosticó a los 40 años, el embarazo a edades tempranas no fue

significativamente protector. Por lo tanto, estos datos y observaciones indican que tanto la edad del primer embarazo como la edad al momento del diagnóstico, son dos criterios importantes para caracterizar el cáncer de mama en dos categorías que responden de diferente manera a los factores de riesgo a edad temprana, y a su patogénesis.

Un dato que resulta relevante es que, en mujeres menores de 40 años judías Asquenazí, portadoras de mutaciones en los genes antes mencionados y en mujeres afroamericanas, es común el diagnóstico y desarrollo de tumores triple negativo de tipo basal, con características clínico-patológicas similares. Esto deja en evidencia que hay un componente genético muy fuerte, además de la importancia de la epigenética.

1.6. Factores pronósticos y predictivos del cáncer de mama.

Los factores pronósticos y predictivos desempeñan un papel crucial en la evaluación y tratamiento del cáncer de mama.

Un factor pronóstico es una medida disponible en el momento del diagnóstico o la cirugía que se correlaciona con la evolución de la enfermedad en ausencia de tratamiento sistémico adyuvante. Estos factores ayudan a identificar a las pacientes que podrían beneficiarse de un tratamiento adyuvante. Por otro lado, un factor predictivo es una medida que permite predecir la respuesta de una paciente a un tratamiento específico, ayudando a determinar el enfoque terapéutico más adecuado para ella (Https://Seom.Org/, n.d.).

Es importante destacar que algunos factores pueden tener un doble papel como pronóstico y predictivo.

En el caso del cáncer de mama, los principales factores pronósticos se obtienen a partir de la biopsia, pero también hay factores dependientes de la paciente, como la edad y el estado menopáusico. Además de estos factores, se consideran:

- Tamaño tumoral: A mayor tamaño del tumor, mayor es el riesgo de recurrencia.
- Afección de los ganglios axilares: El número de ganglios linfáticos afectados es el factor pronóstico más importante. Cuanto mayor sea el número de ganglios afectados, mayor será el riesgo de recurrencia.
- Grado de diferenciación celular: La diferenciación celular del tumor también influye en el pronóstico. Cuanto menos diferenciado sea el tumor, peor será el pronóstico.
- Expresión de receptores hormonales: La presencia de receptores hormonales es un factor pronóstico favorable, en muchos casos, y también ayuda a predecir la respuesta al tratamiento hormonal.
- Expresión o amplificación de HER2: La presencia de HER2 es un factor pronóstico desfavorable, pero también predice la respuesta a tratamientos dirigidos contra HER2, como el trastuzumab. El uso de terapia anti-HER2 ha mejorado el pronóstico en estos casos.
- Subtipo de cáncer de mama: El subtipo luminal A presenta el mejor pronóstico, mientras que el subtipo triple negativo muestra un pronóstico menos favorable.

Estos factores pronósticos y predictivos desempeñan un papel fundamental en la toma de decisiones terapéuticas y en la planificación del tratamiento personalizado para cada paciente con cáncer de mama (*Https://Seom.Org/*, n.d.).

La experiencia y la investigación, hoy en día, ha demostrado que algunos factores relacionados al estilo de vida de las mujeres, las protegen del desarrollo del cáncer de

seno. Cursar un embarazo a término antes de los 20 años o, tener múltiples partos y la lactancia fueron algunos de los factores observados en la mayoría de los grupos étnicos y en mujeres con mutaciones de BRCA1 o BRCA2. Sin embargo, en mujeres cuyo cáncer de mama se diagnosticó a los 40 años, el embarazo a edades tempranas no fue significativamente protector. Por lo tanto, estos datos y observaciones indican que tanto la edad del primer embarazo como la edad al momento del diagnóstico, son dos criterios importantes para caracterizar el cáncer de mama en dos categorías que responden de diferente manera a los factores de riesgo a edad temprana, y a su patogénesis (American Cancer Society, n.d.).

1.7. Detección temprana, nuevos tratamientos y mortalidad.

La introducción de programas de screening en muchos países desarrollados a finales de la década de los 80, contribuyó a incrementar exponencialmente las tasas de incidencia del cáncer de mama en poblaciones objetivo. Por un lado, gracias a la detección en etapas preclínicas de la enfermedad y por el otro al diagnóstico de tumores pequeños y biológicamente inofensivos que, en ausencia de detección, no habrían sido diagnosticados.

Luego de 20 años de los primeros protocolos de *screening* de mamografías en poblaciones, se ha visto que la tasa decreciente de mortalidad fue consistente con la predicción basada en los ensayos clínicos aleatorios realizados en Europa y Estados Unidos entre 1963 y 1983 (Merino Bonilla et al., 2017).

Con la experiencia adquirida a lo largo de los años, los autores confirman que no todos los cánceres de mama tienen comportamientos biológicos similares, dado que cada paciente responde de forma distinta a las terapias aun habiendo sido diagnosticados en el mismo estadio del tumor (Merino Bonilla et al., 2017).

A principios del siglo 21, las nuevas técnicas genómicas disponibles abrieron camino a nuevos tipos de diagnóstico ya que han demostrado una asociación entre la progresión tumoral natural de cada paciente y su perfil de expresión genómica.

Con el surgimiento de nuevas tecnologías crece la precisión en el diagnóstico de cáncer de mama. Siendo esta una de las patologías con mayor prevalencia en mujeres de todo el mundo, es de suma importancia la investigación y consiguiente incorporación de nuevos conocimientos en el área.

En este marco resulta relevante mencionar sobre una rama de la medicina que escapa un tanto de lo tradicional y se relaciona con la microbiota intestinal. En las últimas décadas, la creciente evidencia ha demostrado que la microbiota intestinal juega un rol importante en la carcinogénesis y en la respuesta ante terapias contra el cáncer, ya sea en carcinoma colorrectal, tumores estomacales o bien cáncer de mama (Wang et al., 2021).

Estos hallazgos abren nuevas perspectivas en la investigación y tratamiento del cáncer de mama, y subrayan la importancia de la incorporación de nuevos conocimientos en esta área. Con el continuo surgimiento de nuevas tecnologías y enfoques, se espera una mejora continua en la precisión del diagnóstico y en el desarrollo de terapias más personalizadas y efectivas para combatir esta enfermedad tan prevalente (Wang et al., 2021).

1.8. Introducción al microbioma humano y relevancia del microbioma intestinal.

La microbiota se refiere a la amplia comunidad de microorganismos de diferentes especies que habita en el cuerpo humano. Por otro lado, el microbioma se define como el conjunto de microorganismos, su material genético y sus metabolitos presentes en un nicho ecológico específico. Este incluye además bacterias, hongos, parásitos y virus. Las interacciones cooperativas entre los microbios y sus huéspedes típicamente involucran la participación microbiana en funciones vitales del mismo como respuesta inmune, metabolismo y reproducción. En un estudio, al comparar ratones libres de gérmenes y ratones normales se comprobó que la microbiota es responsable de una gran cantidad de metabolitos que se han detectado en plasma. Se compararon extractos plasmáticos entre los 2 grupos de ratones utilizando métodos basados en espectrometría de masas. Se demostró que la producción de IPA (un derivado de triptófano con propiedades antioxidantes) se vio afectada, estando directamente relacionada con la bacteria Clostridium Sporogenes, así como también se observó un aumento significativo de ciertos ácidos orgánicos en presencia de algunos microbios intestinales (Cho & Blaser, 2012).

En individuos sanos, los microorganismos coexisten "pacíficamente" tanto en el intestino, como en el resto del cuerpo, sin embargo, cuando ese pacto de convivencia se rompe, se da un ambiente propicio para el desarrollo de enfermedades crónicas, como cáncer, enfermedades metabólicas, enfermedades autoinmunes, etc.

La microbiota de cada individuo es única y forma una especie de huella dactilar genética que se va modificando a lo largo de la vida. La primera exposición se da al momento del parto en el contacto con el canal vaginal, seguido de la lactancia, donde la madre le pasa al lactante sus microorganismos por medio de la leche materna. Más adelante, la exposición al medioambiente, el estilo de vida y la alimentación de cada individuo se encarga de ir modulando el microbioma para que este sea beneficioso o perjudicial para la salud (Https://Www.Hsph.Harvard.Edu/, n.d.). A su vez, con el avance de las tecnologías de secuenciación, se reveló una variación sustancial del microbioma dentro de un individuo en diferentes sitios anatómicos estudiados y una variación entre individuos en los mismos sitios anatómicos. Sin embargo, a nivel de *Filo*, las características taxonómicas muestran cierta estabilidad longitudinal en la mayoría de los individuos. Las diferencias observadas entre los diferentes huéspedes humanos y a su vez las similitudes entre los diferentes nichos anatómicos proporcionan un marco importante para determinar la relación biológica y patológica de una composición microbiana particular (Cho & Blaser, 2012).

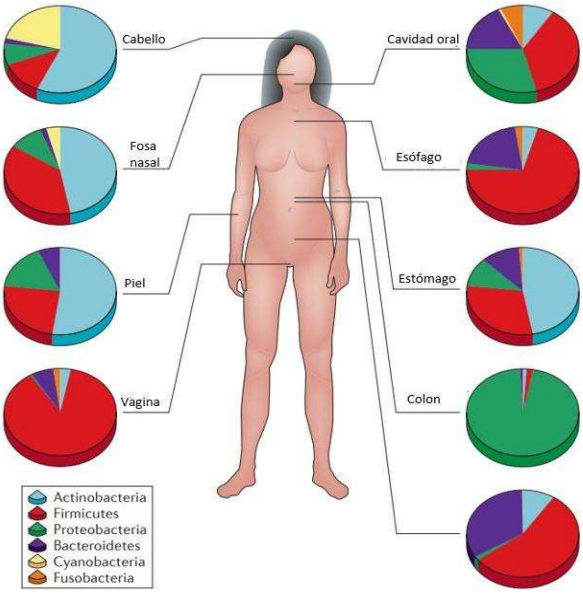


Figura 2: Diferencias en la composición del microbioma en los diferentes sitios anatómicos. Imagen traducida y adaptada de Cho & Blaser, 2012.

En el transcurso del último siglo, el surgimiento de las sociedades urbanas industriales ha modificado de forma drástica el estilo de vida humano en relación con las antiguas sociedades agricultoras. Los cambios, incluyendo vivienda, urbanización, densidad humana, aislamiento del medio ambiente, ventilación, dieta, vestimenta, actividad física, medicamentos y productos industriales para el cuidado personal, condujeron lentamente a la mala adaptación de los humanos con respecto a su entorno. De hecho, la urbanización se asocia con mayores riesgos de enfermedades inmunitarias y metabólicas como obesidad, trastornos del comportamiento, asma y cáncer, todos los cuales han ido en aumento en las últimas décadas y se relacionaron con la reducción de la diversidad de la microbiota intestinal (Dominguez-Bello et al., 2019).

Los complejos conjuntos de microorganismos que pueblan el tracto gastrointestinal humano están emergiendo como actores indispensables en la gestión de la salud y la enfermedad en los seres humanos. Varias son las funciones esenciales conferidas por el microbioma intestinal al huésped, por ejemplo, la fermentación de componentes alimentarios no digeribles en metabolitos absorbibles, la síntesis de vitaminas esenciales, la eliminación de compuestos tóxicos, la competencia con patógenos, el fortalecimiento de la barrera intestinal y tanto la estimulación como regulación del sistema inmune (Heintz-Buschart & Wilmes, 2018).

La relevancia del intestino en el cuerpo humano reside en que, analógicamente, es una interfaz que conecta el mundo exterior con mundo interior del cuerpo humano, es por ello, que en las últimas décadas y con el avance de la ciencia y la medicina, se ha demostrado que una importante cantidad de condiciones médicas se inician en él. El microbioma intestinal tiene un papel crucial tanto a nivel local como también en otros tejidos del cuerpo. En condiciones “sanas” el microbioma intestinal afecta a la estructura anatómica y fisiológica del intestino aumentando la superficie de absorción, promoviendo la renovación de las vellosidades, incrementando el contenido intraluminal y acelerando el tránsito intestinal (Francisco Guarner, n.d.). Pero también, una función muy valiosa, es la impermeabilidad que le confiere al tubo digestivo ya que, cuando esta se daña, se generan poros transitorios dando lugar a una condición que hoy conocemos como “intestino permeable”, la cual permite que muchas moléculas pasen al torrente sanguíneo, dando

paso a un sinnúmero de reacciones metabólicas no deseadas.

De esta forma, se considera al microbioma intestinal como un órgano virtual (ya que no es un órgano en el sentido anatómico tradicional), dinámico, adaptable y flexible que interviene en procesos metabólicos, inmunológicos y sobre todo es clave para la obtención de nutrientes ingeridos en la dieta. Diversos estudios han demostrado que este "órgano virtual" se ve influenciado por múltiples factores entre ellos, composición de la dieta, modo empleado de amamantamiento, proceso de envejecimiento, geografía, medicación y estrés (Scarpellini et al., 2010).

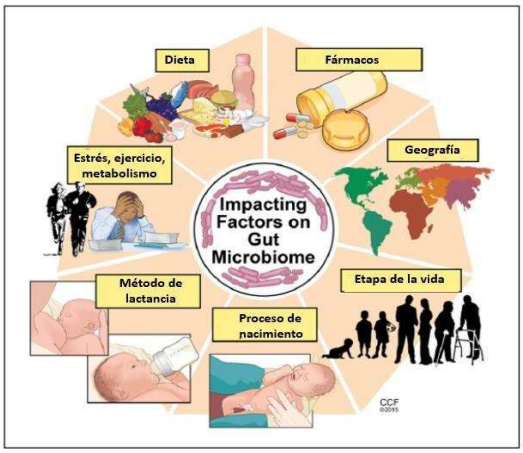


Figura 3: Factores de modulación la microbiota intestinal humana. Imagen traducida y adapta de Cresci & Bawden, 2015.

Dada la creciente evidencia del rol que este tiene en la salud y en la enfermedad, resultó imprescindible su caracterización y clasificación para establecer una microbiota "sana" o, mejor dicho, el microbioma de "individuos sanos". En este marco, el *Human Microbiome Project (HMP),* fundado por el *National Institutes of Health*, utilizó las ciencias ómicas, para producir una gran cantidad de datos a partir de ARN ribosomal (ARNr) 16S de un número considerable de muestras que proporciona hoy, una comprensión preliminar de la biología y la importancia médica del microbioma humano y sus genes colectivos. El HMP ha reportado la estructura y función del microbioma en 300 adultos (18-40 años) en 18 sitios anatómicos diferentes. Este fue un hecho que sentó precedente en este campo de estudio, ya que proporcionó mucha data sobre la complejidad del microbioma lo cual fue punto de partida para las investigaciones consiguientes.

Mientras aislar y cultivar cada especie bacteriana por separado resulta poco rastreable, de gran costo y esfuerzo, la secuenciación y la metagenómica, pusieron a disposición una herramienta muy útil para la reconstrucción de las especies microbianas y también para la función de la colección de nucleótidos contenidos en las muestras de heces. La tecnología de punta como es *Shotgun sequencing*, ha descubierto más de 1900 especies bacterianas no clasificadas además de las 553 que se habían clasificado anteriormente con métodos tradicionales. Esto demuestra que aún hay mucho por investigar y que la pregunta central sobre la relación entre la microbiota y la salud aún no está dilucidada, sin embargo, durante las últimas décadas, se han visto correlaciones entre especies bacterianas como *Bifidobacterium, Akkermansia* y *Lactobacillus*, que tienen un papel benéfico en la salud humana y que incluso ya se comercializan en formato de probióticos, y a su vez se descubrieron géneros como *Bacteroides* y *Ruminococcus* que están implicados en parámetros negativos de la salud (Hills et al., 2019).
Si bien apenas se está comenzando a descubrir cómo todo lo que ingerimos influye

sustancialmente en los procesos patológicos se cree que en el futuro debería estudiarse en mayor profundidad al microbioma intestinal como un biomarcador para indicaciones dietéticas y también analizar el efecto de la suplementación probiótica en la salud clínica para tratamiento o prevención de enfermedades. Terapias bacterianas como, por ejemplo, los trasplantes de materia fecal para repoblar intestinos difíciles de recomponer por vías tradicionales, será un área de interés en el futuro cercano (Cresci & Bawden, 2015).

1.9. Microbioma y su relación con el cáncer.

En 1868 se comenzó a investigar sobre la influencia de los microbios en el cáncer, cuando William Busch informó una regresión tumoral de sarcoma en pacientes infectados con *Streptococcus pyogenes* (Mager, 2006). Durante las décadas que siguieron, diversas situaciones poco favorables en la investigación sobre el tema condujeron a dejar de lado esta teoría. La teoría viral del cáncer resurgió en 1911 con el descubrimiento del sarcoma de Rous, el primer oncovirus identificado capaz de transformar tejido benigno en tejido maligno en pollos. Los grandes esfuerzos por encontrar virus detrás de cada cáncer fallaron dando lugar a la relación del cáncer con las mutaciones somáticas. Hoy en día se han encontrado interesantes afirmaciones acerca de la importancia de los microbios, incluyendo las bacterias y hongos, en el cáncer y en la terapia antitumoral (Mager, 2006). Son pocos los microbios que se han relacionado directamente como causantes del cáncer, sin embargo, muchos parecen estar implicados en su crecimiento, actuando a través del sistema inmunológico del huésped. A través de diversos estudios se pudo demostrar las interacciones de la microbiota con el sistema inmune y se revelaron poderosos efectos antitumorales moduladores de la actividad del tejido linfático. Muchas de estas vías invocan la señalización de citoquinas por medio de un receptor del tipo *Toll* pero también el efecto metabólico microbiano y el mimetismo antigénico con células cancerosas son de gran relevancia. En algunos modelos preclínicos, los metabolitos también regularon fenotípicamente a los tumores con mutaciones somáticas y modularon la eficacia del inhibidor del sistema de control celular (Sepich-Poore et al., 2021) (Tanoue et al., 2019). Hoy en día existe evidencia experimental sobre microbios con factores virulentos que amplifican la génesis tumoral mediante señalización de *E-cadherin– Wnt–b-catenina* incluyendo FadA de *Fusobacterium nucleatum* y Avra de cepas de *Salmonella*. A su vez, la creciente evidencia científica sugiere una categoría adicional de microbios "cómplices" y de funciones microbianas que promueven la carcinogénesis pero que no son suficientes para causar cáncer *per se*. Esta categoría agrupa muchas funciones inmunomoduladoras de la microbiota y sus metabolitos bioactivos en el desarrollo del tumor y podrían estar linkeadas al rol del sistema inmune en tumores sólidos. Si bien el sistema inmune raramente podría iniciar la lesión, si puede facilitar la progresión mediante el llamado bucle de retroalimentación tumoral, inflamación o inmunovigilancia disfuncional (Rubinstein et al., 2013; Silva-García et al., 2019). En un estudio publicado en 2020, Kadosh et al., postularon que las conocidas mutaciones de p53 son cancerígenas en presencia de ácido gálico producido por actividad microbiana en ciertas porciones del intestino, mientras que tienen un efecto protector o supresor tumoral en otras partes de este, sugiriendo una interacción funcional entre los genes y el microbioma (Kadosh et al., 2020). Otro ejemplo se vio en la investigación de Ma et al., que realizaron un estudio en el que observaron que unos ratones tratados con antibióticos presentaban una disminución en sus poblaciones de bacterias grampositivas, incluyendo especies de *Clostridium* que son capaces de metabolizar ácidos biliares primarios en ácidos biliares secundarios y los conducen al hígado por medio de la vena porta. Por otro lado, existe una quimosina que recluta células T asesinas naturales (NKT) para el hígado llamada CXCL16 que, contribuye a un entorno permisivo para el desarrollo y progresión de los tumores

hepáticos malignos. Los ácidos biliares primarios estimulan la expresión de la quimosina CXCL16 y los ácidos secundarios suprimen su expresión. Entonces a mayor cantidad de ácidos biliares secundarios, mayor supresión de CXCL16, decrece el reclutamiento de células NKT y eso crea este ambiente propicio para la progresión del tumor. Por el contrario, una mayor cantidad de ácidos biliares primarios estimula la expresión de CXCL16, incrementa el reclutamiento de células NKT y se produce una contracción del tumor (C. Ma et al., 2018).

Hay diversos mecanismos microbianos que potencialmente manipularían el microambiente tumoral. Sepich-Poore et al., define al conjunto de interacciones inmunomediadas y los bucles de retroalimentación, como el "eje microbioma-inmuno-oncológico" (IOM Fig. 5) y aseguran que, sigue siendo un área clave de descubrimiento en el área de estudio (Sepich-Poore et al., 2021).

1.10. Microbioma intratumoral.

Las bacterias fueron descubiertas hace más de 100 años atrás, en los tejidos tumorales, pero la caracterización del microbioma en la actualidad sigue siendo un desafío debido a la escasa biomasa que se encuentra en dichos tejidos. Se ha visto que la microbiota intestinal tiene múltiples efectos en la biología del tumor, tanto en los procesos de transformación, en la progresión y en la respuesta a terapias como la inmunoterapia (Nejman et al., n.d.).

Nejman et al., han demostrado en un estudio con más de 1.500 muestras, que las bacterias intratumorales son mayormente intracelulares y están presentes tanto en células tumorales como en células de la inmunidad. En este trabajo también se vio que las bacterias intratumorales encontradas, están implicadas en funciones y vías metabólicas asociadas a características clínicas de determinados subtipos de tumores. Algo importante que se evidenció gracias a un análisis a nivel funcional es que, si bien hay una gran variabilidad a nivel de taxones entre los distintos tumores, hay ciertos ambientes que comparten rasgos funcionales bacterianos. La desorganización que se produce en el desarrollo de los tumores y su vascularización con fugas puede permitir, potencialmente, que las bacterias circulantes entren en el tejido y así proveerles un ambiente inmunodeprimido propicio para su refugio y proliferación (Nejman et al., n.d.).

Cabe mencionar que, así como se ha visto que la manipulación de la microbiota intestinal tiene efectos sobre la respuesta inmune ante terapias inhibidoras del punto de control inmunitario, se especula que la manipulación del microbioma tumoral también tendría implicancia en la inmunidad tumoral y la respuesta a las inmunoterapias. De este modo, un mejor entendimiento del microbioma y sus efectos, podrían abrir camino a nuevos tratamientos en pacientes con cáncer (Nejman et al., n.d.).

1.11. Microbioma, cáncer y tejido mamarios.

Inicialmente se pensaba que la mama era estéril, sin embargo, varios estudios recientes han demostrado que hay microorganismos residiendo en el tejido mamario. La microbiota del cáncer de mama en realidad puede originarse en diversos focos como piel, intestino, glándula mamaria y leche materna (Wang et al., 2021).

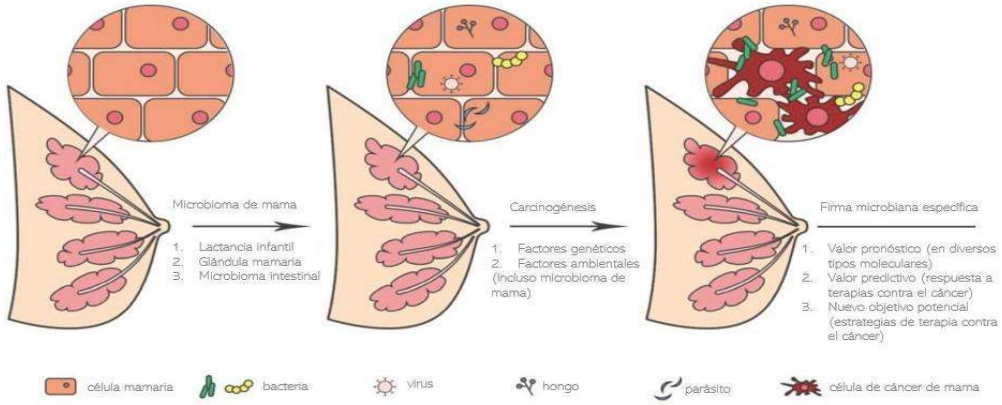


Figura 4: Microbioma relacionado con la mama en el tejido mamario y su potencial carcinogénesis. Imagen traducida y adapta de N. Wang et al., 2021b.

La composición adiposa con drenaje linfático y su extensa vascularización hacen del tejido mamario un ambiente favorable para la locación y crecimiento bacteriano. En ese marco, estudios han demostrado que *Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes* están positivamente relacionados con el metabolismo y la biosíntesis de ácidos grasos (Wang et al., 2021).

En el año 2014, en un estudio publicado por Urbaniak et al., se hipotetizó que los microbios también estaban presentes en el tejido de cáncer de mama dada la presencia de estos en la leche materna, hecho demostrado en otro estudio llevado a cabo por el mismo grupo en el año 2012 en Londres, Inglaterra. Se recolectaron muestras de tejido mamario de 43 mujeres de entre 18 y 90 años de Canadá y 38 muestras de mujeres entre 20 y 85 años de Irlanda. Las muestras provenían de tumores benignos, malignos y mujeres que se realizaron reducción de seno sin antecedentes de cáncer de mama. Si bien los tejidos fueron extraídos de diferentes zonas anatómicas de la mama y teniendo en cuenta las diferencias demográficas, de estilo de vida y patológicas entre las pacientes, se pudo evidenciar una variabilidad en la composición bacteriana del tejido mamario. A pesar de que se encontró como filo principal *Proteobacteria,* tanto en Irlanda como en Canadá, la composición entre países fue diferente. Este resultado llamó la atención ya que difería con el filo principal de otras porciones anatómicas del cuerpo humano, como, por ejemplo, la cavidad oral o la vagina, las cuales presentan este filo en una proporción más reducida, dejando entrever, que la microbiota del tejido mamario es única y diferente a la encontrada en otros sitios (Urbaniak et al., 2014).

En 2016, el mismo grupo de investigadores publicó otro estudio realizado con 70 muestras de tejido fresco extraído de mujeres de entre 19 y 90 años de Canadá, demostrando diferencias significativas a nivel de perfil bacteriano entre voluntarias sanas y pacientes con cáncer de mama. Se realizó secuenciación de la región hipervariable de ADNr 16S en 70 muestras de tejido y 38 controles del medio ambiente. En los resultados se pudieron ver diferencias significativas entre las voluntarias sanas, las cuales presentaron mayor abundancia de los filos *Prevotella, Lactococcus, Streptococcus, Corynebacterium* y *Micrococcus*, y en pacientes con cáncer donde los filos más representativos fueron, *Bacillus, Staphylococcus, Enterobacteriaceae, Comamondaceae* y *Bacteroidetes*. Interesantemente en este estudio, se pudo asociar que *E. coli*, bacteria perteneciente al filo *Enterobacteriaceae* que se mostró relativamente más abundante en pacientes con cáncer que en voluntarias control, tiene cepas que producen una genotoxina llamada colibactina,

que tiene la habilidad de inducir roturas de la doble cadena de ADN e inestabilidad cromosomal. Se aisló *E. coli* y *Satphylococcus epidermis* de las muestras y fueron capaces de inducir roturas de ADN en células *HeLa*. Otro hallazgo interesante fue que 2 bacterias (*Lactococcus* y *Streptococcus*) que se vieron en mayor abudnancia en mujeres control o sanas tienen actividad anti carcinogénica y podrían jugar un rol importante en la prevención de esta patología (Urbaniak et al., 2016).

La etiología del cáncer de mama es compleja y se han descrito múltiples factores de riesgo para los diferentes subtipos de tumor. Mientras que las razones biológicas no son ampliamente conocidas hoy en día, aproximadamente el 70% de los cánceres de mama son del subtipo RE. Cabe aclarar, que una de las funciones más importantes del microbioma es la regulación de los niveles de esteroides en el cuerpo, sobre todo de estrógeno. El estrógeno endógeno es indudablemente un jugador importante en el desarrollo de cáncer de mama, especialmente en mujeres postmenopáusicas. Esta hormona puede circular en el torrente sanguíneo de forma libre o unida a proteínas, variando en potencia y significado biológico. La sumatoria total de genes bacterianos del intestino, capaces de metabolizar estrógenos ha sido denominada "estroboloma" por Plottel y Blasser (Parida & Sharma, 2019). Se cree que un estroboloma activo modula el metabolismo de estrógeno endógeno mediante la circulación enterohepática en virtud de la actividad enzimática de la β-glucuronidasa y β-glucosidasas, afectando la excreción y circulación de estrógenos (Parida & Sharma, 2019).

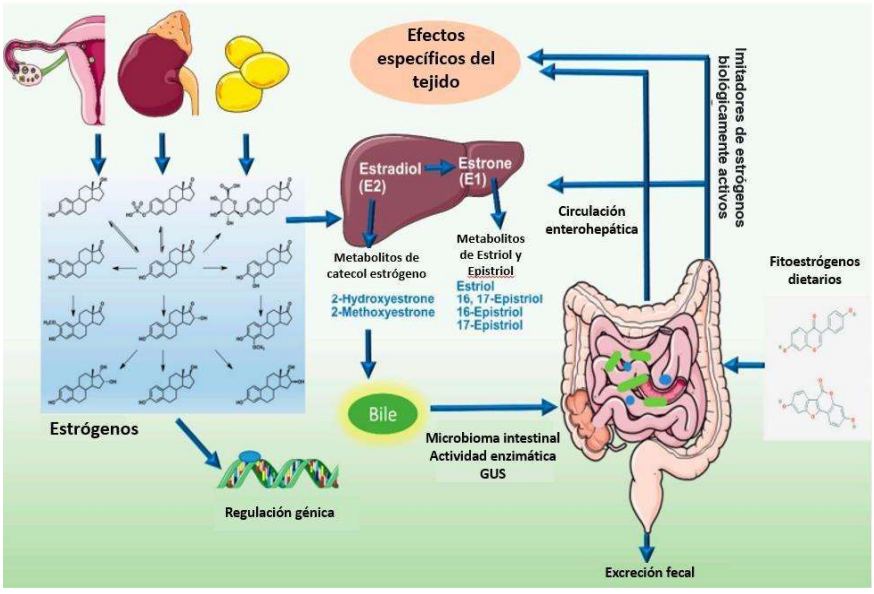


Figura 5: Representación esquemática de la modulación de estrógenos en circulación en el estroboloma. Imagen adaptada y traducida de Parida & Sharma, 2019.

En el hígado se produce la conjugación de los estrógenos y sus metabolitos que luego son eliminados del cuerpo mediante la orina o las heces, o excretados en la bilis. Dichos estrógenos conjugados excretados en la bilis pueden ser desconjugados por especies bacterianas que tienen actividad β-glucuronidasa y volver a ser reabsorbidos en el torrente sanguíneo. Se vio que los estrógenos circulantes tienen un efecto estimulador en los tejidos, sobre todo en el tejido de la mama afectando el crecimiento y la proliferación celular en los tumores RE (Parida & Sharma, 2019).

En línea con esto, en 2019 Butcha, *et al*., utilizando un modelo de ratón de cáncer de mama Her2 positivo, demostraron que una disrupción preestablecida de la homeostasis da como resultado una ventaja en las células tumorales circulantes y por ende una mayor diseminación del tumor, es decir le da una ventaja metastásica al tumor, en dirección a los nódulos linfáticos y a los pulmones. Esta disbiosis del ambiente promovió inflamación temprana dentro de la glándula mamaria que se mantuvo durante la progresión del tumor como también se vio una mejora en la fibrosis y el depósito de colágeno tanto sistémica como localmente dentro del microambiente tumoral llevando a una infiltración mieloide significativa en la glándula y en el tumor (Rosean et al., 2019).

El microbioma humano es enorme y dinámico; la interacción simbiótica entre el genoma y el metagenoma ayuda y complementa a muchas funciones fisiológicas de los huéspedes. Puede promover o prevenir el cáncer de mama mediante la producción de genotoxinas, interviene en el metabolismo de hormonas esteroideas, modula la respuesta inmune, regula la homeostasis energética, regula los niveles de citoquinas y una innumerable cantidad de funciones que aún no conocemos. Sin embargo, por ahora los estudios que demuestran asociaciones funcionales con clases taxonómicas asociadas son limitados. Por eso, es de suma importancia entender con mayor profundidad las huellas microbianas asociadas con el cáncer de mama tanto a nivel local como a nivel gastrointestinal (Parida & Sharma, 2019).

HIPOTESIS

Nuestra **hipótesis de trabajo** asume que se pueden encontrar diferencias en el microbioma del tejido tumoral mamario que favorezcan la evolución tumoral y que estos resultados puedan establecer un potencial factor pronóstico independiente del tiempo libre de metástasis y sobrevida de la paciente, dando la posibilidad de desarrollar terapias alternativas con "probióticos" que permitan establecer un equilibrio favorable para mejorar la calidad de vida de las pacientes.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo es estudiar la relevancia pronóstica del microbioma en la evolución del cáncer de mama. Se espera encontrar diferencias en el microbioma del tejido tumoral mamario que favorezca la evolución tumoral. Para ello se busca identificar los posibles vínculos entre la composición del microbioma tumoral y las características clínico-patológicas, así como también se espera establecer por primera vez las posibles asociaciones entre el microbioma (bacterias asociadas con parámetros de buen o mal pronóstico, las funciones hipotéticas de las vías metabólicas y el potencial de virulencia) y la evolución tumoral en pacientes con cáncer de mama.

Como objetivos específicos se espera:

1. Encontrar nuevos biomarcadores (taxones e hipotéticas vías metabólicas) dentro del perfil bacteriano del tejido tumoral mamario, en pacientes con cáncer de mama temprano.
2. Estudiar las posibles asociaciones entre los resultados obtenidos del objetivo 1 con los datos de los parámetros de pronóstico clásicos del cáncer de mama, así como con otros datos clínico-patológicos, que permitan predecir la evolución del tumor primario y la aparición de futuras metástasis.

METODOLOGÍA

4.1. Lugar de trabajo.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunohematología del Instituto de Biología y Medicina Experimental, IByME, CONICET.

Esta institución cuenta con todas las herramientas e instalaciones necesarias para los experimentos de este estudio. Particularmente hicimos uso de un cuarto de cultivos celulares compartido por varios laboratorios de la institución, que cuenta con una campana clase II, una estufa de cultivos, un microscopio óptico y una centrífuga. Allí se realizaron disgregaciones de tejido mamario y extracción de ADN, se utilizó también para el armado de la *mix* de PCR. Siempre se tuvieron en cuenta los mayores cuidados para lograr un ambiente propicio, estéril y aséptico. Antes de comenzar cualquier tipo de ensayo en este ambiente, se colocaban todos los materiales (tips, guantes, rotuladores, pipetas, etc, excepto material biológico) dentro de la campana y se procedía a encender el UV por 20 minutos sin prender el flujo de aire. Luego se realizaba una limpieza con alcohol al 70% y también se lo utilizaba para esterilizar cada elemento que ingresara a la campana.

Para las PCR, se utilizó un termociclador propiedad del laboratorio del Dr. Calvo Juan Carlos en IByME. Se utilizó esta técnica de amplificación para la región 16S del ARN ribosomal para su consecuente secuenciación y estudio de microbioma. Nuevamente se tuvieron en cuenta todas las medidas necesarias para mantener la integridad de las muestras.

Las corridas electroforéticas se realizaron en el laboratorio de biología molecular de Chagas de INGEBI, CONICET, dentro del mismo edificio. Se utilizaron cubas de electroforesis donde se corrieron los geles de agarosa. Las bandas fueron identificadas en un transiluminador con UV y fueron cortadas para su posterior purificación.

También hicimos uso de la mesada del laboratorio de Inmunohematología de IByME, CONICET, donde se llevaron a cabo todos los procedimientos que no requerían esterilidad, como por ejemplo el uso del kit de extracción de ADN a partir del gel de agarosa.

4.2. Materiales y métodos.

4.2.1. Datos clínico-patológicos.

Para la recolección de estos datos se consideraron los parámetros de pronóstico clásicos del cáncer de mama: edad, tamaño tumoral, grado histológico, Ki67, Her2/neu, receptores hormonales de estrógeno y progesterona y ganglios linfáticos axilares.

Se tuvieron en cuenta también, datos relevantes para el estudio como: hábitos de consumo de alcohol y de tabaco, embarazos, amamantamiento y estado menopáusico.

Para mantener la seguridad de los datos de las pacientes, trabajamos un sistema de código que nos permitió ejecutar de forma eficaz y ordenada todas las tareas.

Se recolectaron otros datos clínico-patológicos como número de pacientes que desarrollaron recidiva local o no local dentro del período de los 5 años postcirugía. Estos datos nos permitieron evaluar el tiempo transcurrido post cirugía libre de enfermedad, de metástasis y la sobrevida a 5 años.

4.2.2. Pacientes.

Se planteó un estudio retrospectivo incluyendo 50 casos consecutivos de pacientes con cáncer de mama temprano, con diagnóstico clínico e histopatológico confirmado por los patólogos.

Los criterios de inclusión fueron:

- Mujeres con carcinoma mamario ductal infiltrante.
- En estadio clínico- patológico temprano I/II (Según la clasificación TNM de la Unión Internacional Contra el Cáncer)
- Con un período de seguimiento de 5 años desde el momento de su cirugía. Los criterios de exclusión fueron:
- Pacientes que hayan recibido tratamiento antes de realizarse la cirugía.
- Pacientes con alguna enfermedad inmunológica de base.
- Pacientes con antecedentes de algún tipo de tumor primario.

4.2.3. Muestras.

Se tomaron muestras teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión de las pacientes para el estudio, criterios consensuados con los médicos patólogos. Las muestras fueron recolectadas antes del 2019, previo a que se desatara la pandemia de Covid-19.

Se trabajó con cortes de biopsias de tejido tumoral mamario congelado del Biobanco de Tejidos del Instituto Oncológico Ángel H. Roffo.

Hubo muestras particulares que no fueron utilizadas por no cumplir con los criterios de inclusión y se excluyeron del análisis.

4.2.4. Obtención de ADN genómico total mediante extracción con Kit comercial.

Para las muestras que provenían del tejido fresco o congeladas se utilizó el kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, cat. 51306) según indicaciones del fabricante (tomando en cuenta todas las precauciones que se mencionan en el *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook pág. 32*).

El procedimiento realizado fue el siguiente:

1. Disgregación mecánica del tejido fresco: se procedió a cortar el tejido fresco entonces congelado, en trozos pequeños del menor tamaño posible. Se emplearon placas de Petri de vidrio y una caja con herramientas que contenía tijeras, bisturí y pinzas, todo previamente esterilizado en estufa a 180 °C por 3 hs.
2. Luego, por cada 25 mg de tejido se agregó 180 ul de solución ATL y 20 ul de proteinasa K. Se mezcló con vórtex y se lo dejó incubar a 56 ° C overnight (16 hs aproximadamente).
3. Una vez pasada la incubación overnight, se agregaron 200 ul de solución AL por cada 25 mg de tejido utilizado, se lo mezcló e incubó por 10 minutos a 70 ° C. Se necesitaba que en este paso la homogeneización sea completa para lograr el mejor rendimiento del proceso.
4. Se agregaron 200 ul de etanol (96% - 100%) por cada 25 mg de tejido. Se lo llevó al vórtex por 15 segundos o hasta que la mezcla se vea homogénea por completo.

5. Se colocó la muestra en una columna que se centrifugó entre 10.000 y 13.000 rpm por minuto. En caso de ser necesario se lo centrifugó por más tiempo.
6. Se pasó la columna a un nuevo tubo colector y se descartó el anterior.
7. Se inició el lavado de la columna, agregando 500 ul de solución AW1 y se llevó a la centrífuga por 1 minuto a 14.000 rpm o hasta que el líquido se haya escurrido por completo.
8. Luego, se agregó 500 ul de la segunda solución de lavado AW2. Se centrifugó a 14.000 rpm esta vez por 3 minutos, nuevamente buscando que no haya líquido remanente en la columna.
9. Se colocó la columna en un tubo colector nuevo y se centrifugó por 1 minuto a 14.000 rpm, para terminar de escurrir la solución de lavado por completo de la columna.
10. Se comenzó con el paso de elución. Se agregaron 100 ul de solución AE que se dejaron incubando 5 minutos a temperatura ambiente (25° C aproximadamente). Se procedió a centrifugar a 14000 rpm.
11. Por último, la columna se pasó a un tubo *Eppendorf RNAsa/DNAsa free* y se lo almacenó hasta su utilización.

4.2.5. Evaluación de la integridad del ADN genómico.

Con el objetivo de evaluar la integridad del ADN genómico extraído de las muestras de tejido congelado, se procede a cuantificar y luego hacer una corrida electroforética.

La cuantificación se ejecutó utilizando un equipo *NanoDrop* (Espectrofotómetro *NanoDrop* TM 2000). Para tal fin se utilizó 1 ul de cada muestra.

Luego se procedió a evaluar la integridad y para eso se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Para tal fin, se sembraron 300 ng del ADN obtenido de la columna de extracción de cada muestra con un marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen TM, cat. 10787018).

4.2.6. Obtención del microbioma.

Como ya mencionamos, el microbioma es un conjunto formado por microorganismos, su material genético y sus metabolitos, en un nicho ecológico dado. Para su estudio es necesario poder obtener ARNr 16S, ya que es una secuencia altamente conservada de las bacterias que sirve para armar mapas filogenéticos. El ARNr 16S codifica para una molécula de ARN ribosomal 30S presente en todas las células procariotas, incluyendo bacterias y arquea. La subunidad ribosomal 50S contiene a las subunidades 23S y 5S del ARNr. Los genes que codifican para los componentes del ribosoma se fueron conservando mayoritariamente, esto significa que sus estructuras han variado insignificantemente a lo largo del tiempo debido a la importancia de su función. (*Fukuda2016*, n.d.)

El ARNr 16S es una herramienta comúnmente utilizada por varias razones, entre ellas:

- El gen es relativamente corto, 1500 pb aproximadamente.
- Hay 10 regiones en la secuencia genética de ARNr 16S, que son comunes entre la mayoría de las bacterias, denominadas regiones conservadas y están separadas en 9 regiones diversas llamadas regiones hipervariables (Fig. 6). Por lo tanto, hay *primers* universales establecidos para dichas regiones conservadas, lo cual hace que su utilización en investigación sea sencilla y accesible.

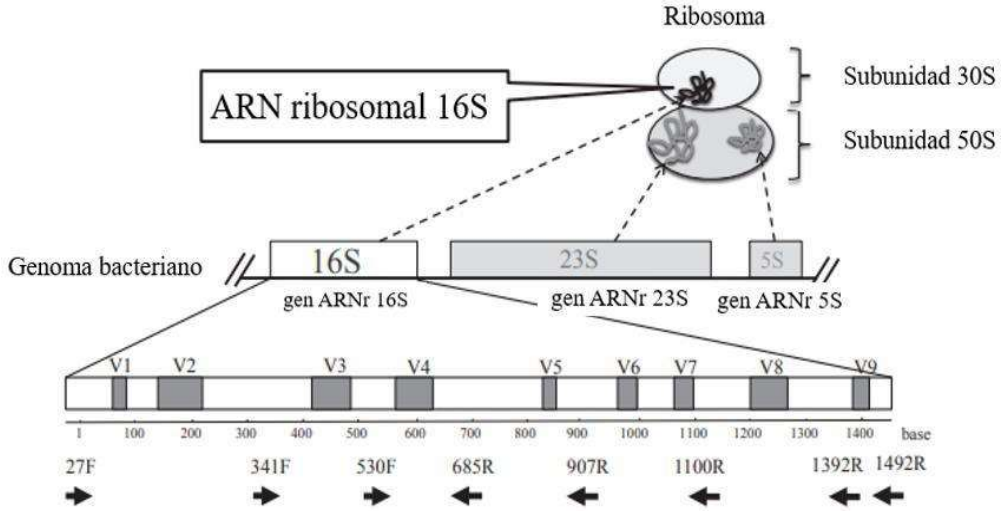


Figura 6: Representación esquemática del complejo ribosomal y del gen del ARNr 16S. Los cubos blancos y grises indican las regiones conservadas e hipervariables respectivamente. Las flechas negras muestran las posiciones aproximadas de los *primers* universales para el ARNr 16S de Escherichia coli. Imagen traducida y adaptada de Fukuda2016, n.d.

Por eso, luego de la extracción de ADN genómico se realizó una amplificación de la región hipervariable V4-V4. Esto se realizó en el instituto y fue necesario ya que el microbioma intratumoral es sumamente complejo de levantar con los adaptadores de Illumina que utilizaban en la empresa donde enviamos a secuenciar. Para eso mandamos a sintetizar los *primers* V4- V4 con los adaptadores correspondientes y establecimos las condiciones de PCR adecuadas para poder levantar *in-house* el primer ciclo de PCR. Luego de obtener el producto amplificado se procedió a realizar una corrida electroforética para identificar la banda que contenía nuestra secuencia de interés. Para eso se utilizó agarosa al 0.8% con su correspondiente bromuro de etidio y se sembró la muestra junto con el marcador de peso molecular (PB-L Productos Bio- Lógicos, cat. MA0202). Se purificaron las bandas y fueron enviadas a secuenciar a la empresa Héritas en Rosario. Esta empresa utiliza equipos NGS de *Illumina.*

En esta investigación, el perfil bacteriano se identificó estudiando la región hipervariable V4 del ARNr (Fig. 7).

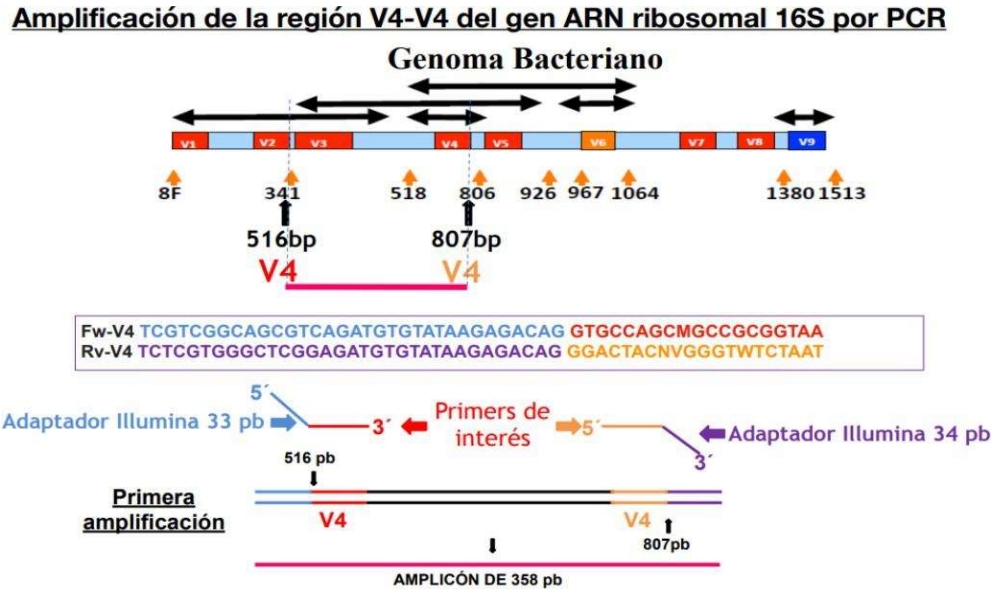


Figura 7: Esquematización del producto amplificado utilizando los primers V4-V4 mencionados en el genoma bacteriano.

4.2.7. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa.

Para lograr el primer producto amplificado de la secuencia de interés, realizamos PCR con el siguiente programa:

TABLA II: Programa de PCR final utilizado para la amplificación de la región hipervariable V4-V4 de las 50 muestras recibidas Del Hospital H. Roffo.

V4 - V4		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94	2'	34
94	30"	
64	45"	
72	30"	
72	2'	

Luego de obtener el producto amplificado se procedió a realizar una corrida electroforética para identificar la banda que contenía nuestra secuencia de interés. Para eso se utilizó agarosa al 0.8% con su correspondiente bromuro de etidio y se sembró la muestra junto con el marcador de peso molecular (PB-L Productos Bio-Lógicos, cat. MA0202).

4.2.8. Obtención del producto amplificado a partir de gel de agarosa.

El gel de la corrida electroforética se llevó al transiluminador UV, con todos los cuidados correspondientes, y en los casos donde se observó la banda de interés se procedió a realizar cortes con bisturí/lanceta, para levantar el fragmento y reservarlo en tubos *Eppendorf* debidamente rotulados para cada paciente. En la mayoría de los casos, los tubos *Eppendorf* se almacenaron en freezer -20 °C hasta llegado el momento de su procesamiento.

Para extraer el ADN de las bandas de gel se utilizó el kit *EasyPure® Quick Gel Extraction Kit* (Transbiotech, cat. EG 101). El procedimiento fue el siguiente:

- Se agregaron 3 volúmenes de la solución de la solución GSB por cada volumen de gel (100 mg) y se lo dejó incubar a 55 °C por 10 minutos.
- Una vez pasados los 10 minutos se lo mezcló con vórtex durante 2/3 minutos hasta su homogeneización.
- Se dejó llegar la solución a temperatura ambiente y se colocó la muestra en una columna.
- Se dejó incubar 1 minuto y se centrifugó a 13.000 rpm mínimo por 1 minuto.
- Luego se pasó la columna a un tubo colector nuevo, descartando el anterior.
- El paso siguiente fue el lavado con solución WB, agregando 650 ul de esta, centrifugando a máxima velocidad, 14.000 rpm por 1 minuto o hasta que no haya

quedado líquido remanente en la columna.

- Luego se colocó la columna en un tubo colector nuevo y se llevó a centrifugar nuevamente a 14.000 rpm por 1 minuto, con el propósito de escurrir en su totalidad la solución de lavado de la columna.
- Se pasó la columna a un tubo *Eppendorf* RNAsa/DNAsa *free*.
- Se comenzó con la elución agregando entre 30 ul y 50 ul de solución EB y se dejó actuar 1 minuto a temperatura ambiente (25 °C aprox).
- Se centrifugó a máxima velocidad
- Se obtuvo el ADN y se almacenó en un freezer a -20 °C hasta el momento de secuenciar y enviar a Rosario (Héritas).

En cada paso se tomó como medida preventiva utilizar el vórtex para los reactivos del kit, evitando la formación de precipitados.

4.2.9. Identificación de perfil bacteriano.

Se enviaron las regiones hipervariables V4-V4 del gen ARNr 16S a Héritas, en la ciudad de Rosario. Se tomaron las medidas de seguridad necesarias para el transporte de estas. Allí se continuó con el protocolo establecido para el equipo de secuenciación *Illumina* y consiguiente obtención de la secuencia requerida.

El Dr. Martín P. Vázquez colaboró en este procedimiento, entregando los datos crudos para el trabajo, junto a su equipo de Héritas.

4.2.10. Análisis de la diversidad del microbioma.

Para la identificación de la microbiota se utilizó la construcción de una biblioteca con las regiones hipervariables V4-V4 del gen ARNr 16S a partir de 300 ng de ADN purificado obtenido de las muestras de pacientes con cáncer de mama. Para la secuenciación se utilizó un secuenciador *MiSeq-Illumina* en dirección 5' y 3' (*paired-end*), garantizando secuencias de ~ 358 pb con 200.000 lecturas promedio por individuo para la identificación taxonómica. El recorte de las lecturas de baja calidad y la demultiplexación se realizó utilizando *Trimmomatic* v0.32. Las secuencias generadas se analizaron mediante el software *Qiime2* para la identificación de variantes de secuencia del amplicón (ASV), su posterior asignación taxonómica y el análisis estadístico. Las secuencias obtenidas en este estudio fueron remitidas a la base de datos SRA de NCBI. De esta manera obtuvimos la *clasificación OTUs* (unidades taxonómicas operativas) observadas donde se estudió la diversidad del microbioma utilizando el análisis de diversidad alfa, basado en la riqueza de secuencias OTUs entre las muestras. Adicionalmente, se estudió a las comunidades microbianas de las diferentes muestras en comparación a los parámetros clásicos del cáncer de mama para evaluar si había diferencias significativas en su diversidad alfa utilizando el índice *Shannon, Chao 1 y Eveness*.

Se tuvo en consideración también, el estudio de la diversidad beta, la cual evalúa diferencias en la composición bacteriana (a diferencia de la alfa, que evalúa diferencias en la riqueza) entre las muestras y los parámetros clásicos del cáncer de mama, mediante el análisis de Coordenadas Principales (*Principal Coordinates Analysis*, PCoA), con el algoritmo *Unifrac.*

Los análisis estadísticos complementarios se llevaron a cabo con el programa R Studio v1.2.5001 considerando el valor de $p<0,05$ como estadísticamente significativo.

Se empleó el método de corrección de Bonferroni cuando se realizaron múltiples comparaciones entre los grupos de individuos. Esta parte del trabajo se realizó con el Dr. Penas Steinhardt A y su equipo de colaboradores, quienes formaron parte de esta tesina de licenciatura.

4.2.11. Estudio de las comunidades microbianas y sus posibles vías metabólicas.

Se quiso investigar sobre el hipotético rol de las comunidades microbianas, presentes en el tejido tumoral mamario, en la actividad metabólica moduladora del desarrollo negativo o positivo del tumor, para lo cual se examinó la función microbiana y la composición enzimática obtenidas a partir de las secuencias del microbioma. Se utilizó una base de datos bioinformática llamada KEGG (*Genome Med*. 2015; 7:55; Sci Rep. 2015; 5:14554; Sci Rep. 2016; 6:28061). A su vez, se utilizó PICRUST, herramienta diseñada para predecir contenido metagenómico funcional de un gen específico o genomas completos para inferir las funciones de los genes de las bacterias estudiadas. Se comparó el perfil de las funciones metabólicas, predichas por PICRUSt, mediante gráficas de barra de error extendido con el software STAMP.

La herramienta PICRUSt proporciona la inferencia de genes de forma precalculada mientras que la inferencia metagenómica la proporciona a partir de datos de abundancia de OTUs, generados por QIIME.

Para este estudio contamos con la ayuda del Dr. Penas Steinhardt A y su equipo de colaboradores.

RESULTADOS

5.1. Preparación de muestras.

5.1.1. Cuantificación de ADN genómico de tejido congelado.

Luego de la extracción de ADN genómico a partir de cortes de tejido congelado de 52 muestras de tumor de mama del Hospital Roffo, se midió su concentración mediante NanoDrop, obteniendo los siguientes resultados (TABLA III). Como esta etapa de la investigación es una continuación de una investigación anterior, ya se había comenzado este proceso en el pasado. En mí tesina, solo fue necesario cuantificar 15 de las 52 muestras totales, ya que el resto habían sido cuantificadas anteriormente y se había almacenado en freezer a -20° C hasta su debido uso.

TABLA III: Cuantificación del ADN genómico obtenido de 15 muestras de un total de 52 muestras de tejido tumoral mamario congelado provisto desde el Biobanco de Tejido del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Proceso realizado utilizando *Nanodrop.*

Muestra	Tubo	DNA ng/µl	Absorbancia 260	Absorbancia 280	Abs. 260/280
572	1	728,5	15	7,592	1,9
	2	313,2	6,265	3,262	1,9

	3	574,1	11,482	6,231	1,8
633	1	666,7	13,335	6,855	1,9
	2	345,6	6,913	3,529	1,9
	3	203,7	4,074	2,128	1,9
697	1	256	5,119	2,53	2
	2	116,9	2,338	1,212	1,9
	3	72,7	1,455	0,759	1,9
840	1	631,9	12,638	6,605	1,9
	2	501,8	10,037	5,342	1,8
	3	105,3	2,105	1,114	1,8
915	1	554,8	11,095	5,847	1,8
	2	482,6	9,652	5,019	1,9
	3	194	3,881	2,036	1,9
929	1	928,9	18,577	9,796	1,8
	2	292,4	5,849	3,072	1,9
	3	10,3	0,206	0,098	2,1
947	1	401,4	8,029	4,051	1,9
	2	214,2	4,283	2,229	1,9
	3	48,1	0,962	0,496	1,9

711	1	39.9	0,798	0,342	2,3
	2	18,9	0,378	0,195	1,9
	3	13,4	0,268	0,156	1,7
739	1	135,1	2,703	1,337	2,02
	2	5,1	0,102	0,051	2
	3	-1,3	-0,025	-0,012	2
950	1	180,1	3,602	1,7	2,1
	2	55,6	1,113	0,614	1,8
	3	21,1	0,422	0,211	2
977	1	1490,9	29,819	15,803	1,8
	2	574,5	11,49	5,883	1,9
	3	201,2	4,024	2,042	1,9
939	1	1062,3	21,245	11,103	1,9
	2	223	4,46	2,318	1,9
	3	79,1	1,583	0,833	1,9
963	1	222,5	4,451	2,186	2
	2	39,5	0,791	0,406	1,9
	3	5,8	0,116	0,053	2,1
1001	1	624,5	12,49	6,452	1,9

	2	132,1	2,642	1,353	1,9
	3	34,9	0,698	0,352	1,9
1016	1	95,5	1,911	0,881	2,1
	2	253	5,059	3,217	1,5
	3	33,1	0,662	0,342	1,9

Se dividió a las muestras en 3 tubos diferentes con el fin de poder trabajar con mayor seguridad y crear un stock de estas para su posterior análisis en caso de que sea necesario.

5.1.2. Integridad del ADN genómico obtenido.

Para determinar la integridad de estas 15 muestras, procedimos a realizar una electroforesis en gel de agarosa, utilizando una alícuota del ADN extraído de las muestras congeladas, con el objetivo de evaluar la calidad de estas, lo que nos permitiría continuar o no con el paso de amplificación. Nuevamente, al ser un proceso que ya se había comenzado en la investigación anterior de la cual fui colaboradora y aprendiz, en esta sección del documento solo mostraré los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación. A tal fin, se corrieron las 15 muestras que recibimos en el año 2021 (Figura 8):

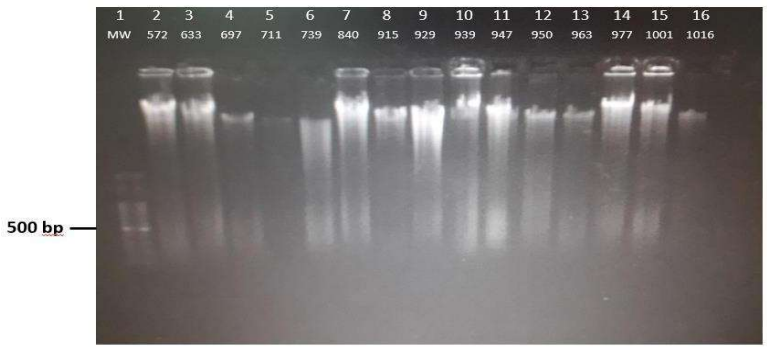


Figura 8. Determinación de la integridad del ADN genómico obtenido de **1**5 muestras de un total de 52 muestras de tejido tumoral mamario congelado (**2-16**). MW: Marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen TM, cat. 10787018). Gel de agarosa al 1%.

Como se puede observar en la **Figura 8**, las muestras conservan su integridad, es decir, no están degradadas y son aptas para continuar el protocolo. En la calle n°1 sembramos el marcador de peso molecular (MW, 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen TM, cat. 10787018), y de las calles 2 a 16 sembramos las muestras de tejido congelado.

5.1.3. Amplificación de ADN genómico obtenido necesario previo a la secuenciación.

En experiencias previas se habían enviado los extractos de ADN genómico directamente a Rosario (Héritas) para su secuenciación, pero en ese procedimiento se encontraron con

la dificultad de no poder levantar nuestro microbioma con el protocolo que utilizaban de manera estándar en su laboratorio, ya que este estaba puesto a punto para muestras de materia fecal o saliva, donde se suele encontrar una carga bacteriana alta. Por esta razón, nos vimos en la inminente necesidad de desarrollar en nuestro laboratorio, un paso previo a la secuenciación realizada en Héritas, de forma de lograr un primer producto amplificado por PCR que luego sería enviado a Rosario para su correcta secuenciación.
Para tal fin solicitamos la síntesis de los *primers* adecuados para el adaptador de *Illumina* que usamos, en este caso el V4-V4. La construcción de los *primers* y el producto obtenido posterior a la primera amplificación por PCR se muestran en la Figura 9.

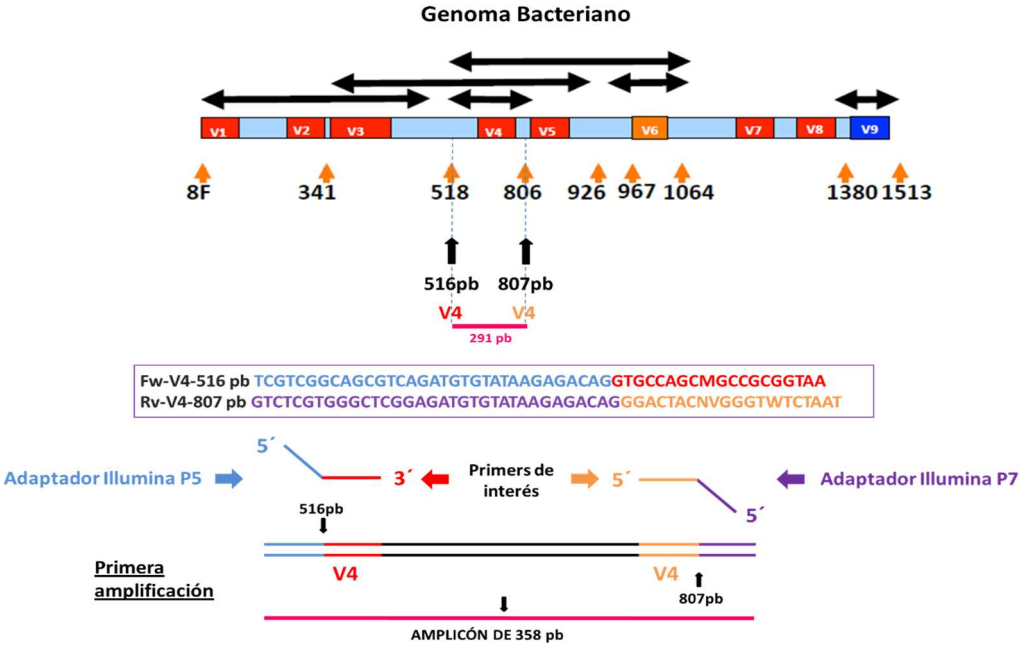


Figura 9: **Esquema del producto amplificado** utilizando los *primers* V4-V4 en el genoma bacteriano.

Se procedió con la amplificación mediante PCR, de la región hipervariable V4-V4. Luego de realizada la amplificación, se realizó una corrida electroforética con el fin de identificar nuestra banda de interés (de aproximadamente 358 pb).

Los resultados obtenidos en las corridas electroforéticas los mostramos a continuación. Todas las figuras expuestas mantienen un formato que responde a: 2 calles correspondientes al control positivo (+) y negativo (-), 1 calle correspondiente al marcador de peso molecular y el resto de las calles, pertenecientes a cada una de las muestras seleccionadas según los criterios de inclusión de este proyecto. Señalamos con flechas amarillas aquellas bandas que dieron el resultado esperado (358 pb) y también una referencia del marcador de peso molecular para mejor entendimiento de la imagen y del tamaño de las bandas. Todas las bandas del tamaño de interés fueron aisladas, cortadas con una lanceta, manteniendo todos los cuidados correspondientes, y posteriormente enviadas a Rosario para su secuenciación.

En la **Figura 10** podemos observar la amplificación de un conjunto de 8 muestras de tejido congelado. En esta oportunidad se visualizan 2 bandas del tamaño de interés en las calles 16 y 20. Cabe destacar que para esta amplificación se utilizó el *primer* de la región hipervariable V3-V4 (*primers* que se utilizaban en la investigación previa), por eso la banda de interés tiene un tamaño aproximado de 506 pb. Ambas bandas se seccionaron con una lanceta estéril y se refrigeraron a -20°C para su posterior envío a Héritas, Rosario.

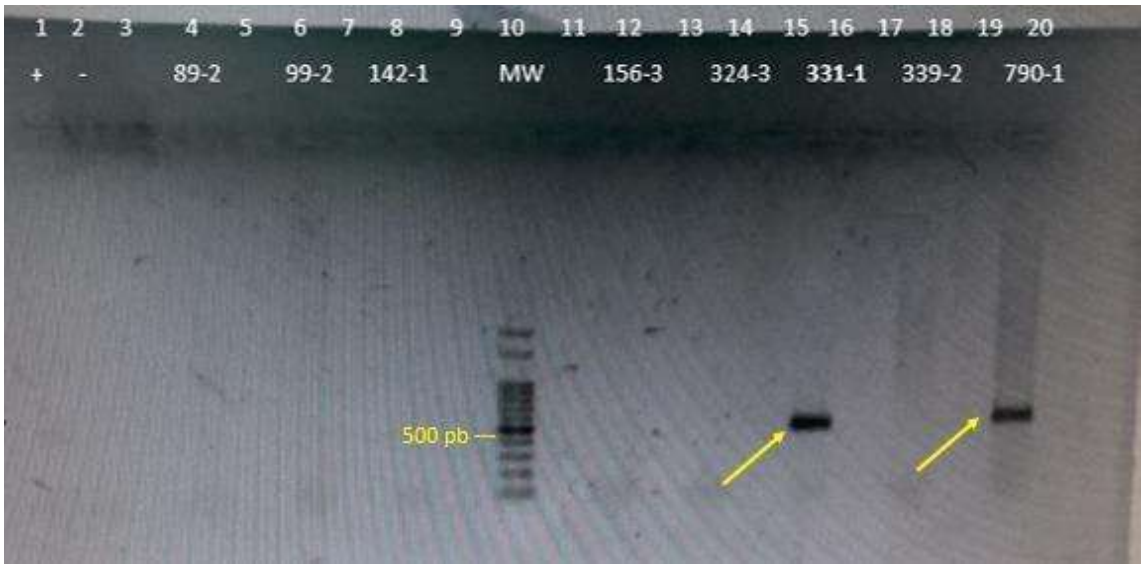


Figura 10: Amplificación de 8 muestras de tejido congelado de cáncer de mama en gel de agarosa al 1%. C-: control negativo, sin ADN. C+: Control positivo, con ADN de *E. coli.*

Llamativamente, de la totalidad de 8 muestras, solo 2 levantaron y con mucha intensidad, además como se puede observar, en el control positivo la banda es prácticamente imperceptible en la imagen (en el momento del experimento, en la computadora que utilizamos si se veía una tenue banda). Decidimos hacer una prueba con ambos *primers*, V3-V4 y V4-V4 **Figura 11,** ya que sospechábamos un posible problema con los primers. Podemos observar con claridad que el *primer* V4-V4 (a la derecha en la figura) levanta el fragmento del tamaño buscado, por eso, decidimos continuar con el uso de este *primer*.

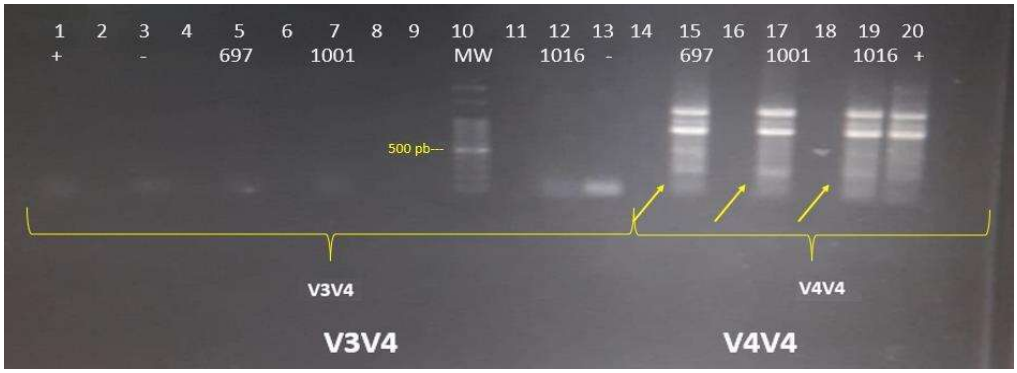


Figura 11: A la izquierda se ve la amplificación de 3 muestras de tejido congelado de cáncer de mama utilizando primers V3-V4 en gel de agarosa al 1%. C-: control negativo, sin ADN. C+: Control positivo, con ADN de E. coli. A la derecha se ve la amplificación de 3 muestras de tejido congelado de cáncer de mama utilizando primers V4-V4 en gel de agarosa al 1%. C-: control negativo, sin ADN. C+: Control positivo, con ADN de E. coli.

El gel de la **Figura 12** se tomó como prueba y se continuó amplificando la región de interés en el resto de las muestras. A continuación, en la **Figura 5**, podemos observar una corrida electroforética de un conjunto de 12 muestras, evidenciando banda de interés en las calles 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14 y 15.

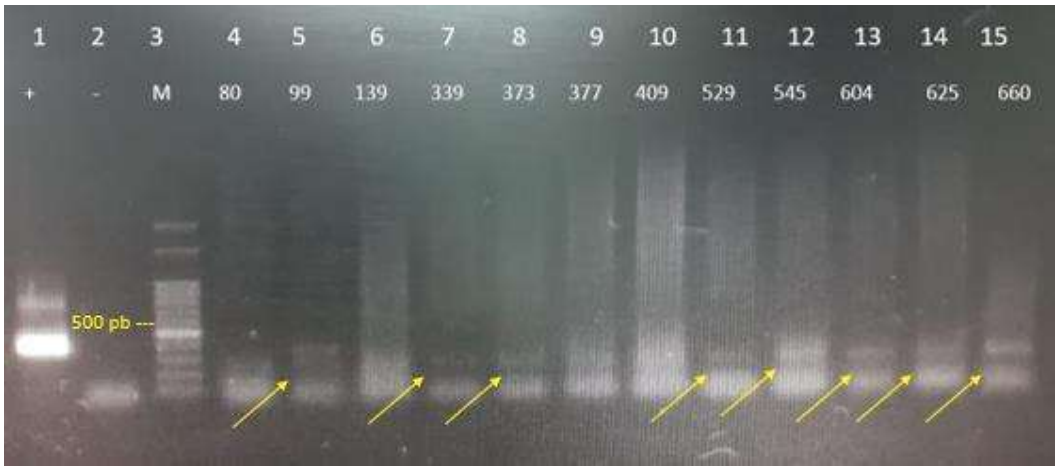


Figura 12: Amplificación de 12 muestras de tejido congelado de cáncer de mama en gel de agarosa al 1%. C-: control negativo, sin ADN. C+: Control positivo, con ADN de E. coli. Se evidencian 8 bandas del tamaño de interés señaladas en amarillo.

Se corrió otra tanda de 11 muestras en la **Figura 13**, donde se puede evidenciar nuestra banda de interés en las calles 7, 11, 12, 13, 14 y 15 a continuación.

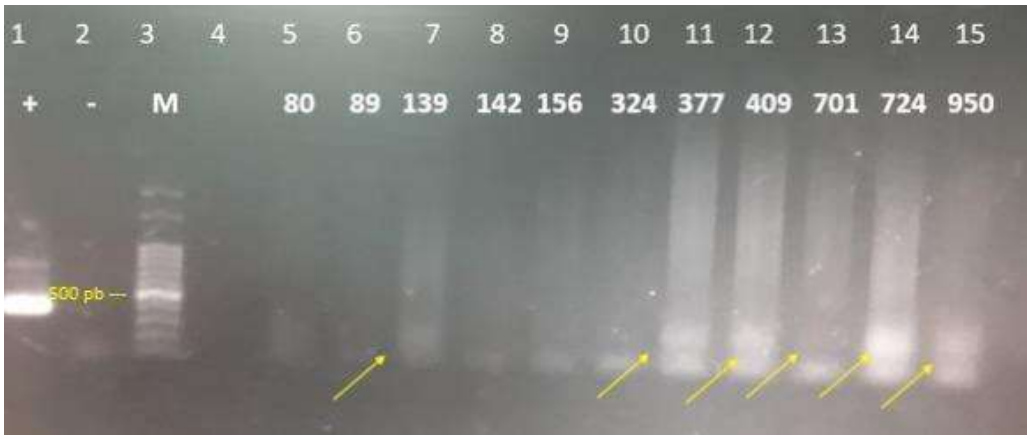


Figura 13: Amplificación de 11 muestras de tejido congelado de cáncer de mama en gel de agarosa al 1%. C-: control negativo, sin ADN. C+: Control positivo, con ADN de E. coli. Se evidencian 6 bandas del tamaño de interés señaladas en amarillo.

A continuación, se seleccionaron 8 muestras más para una corrida electroforética donde se pudo evidenciar el fragmento del tamaño buscado en la totalidad de las muestras, desde la calle 7 hasta la 14 (**Figura 14**).

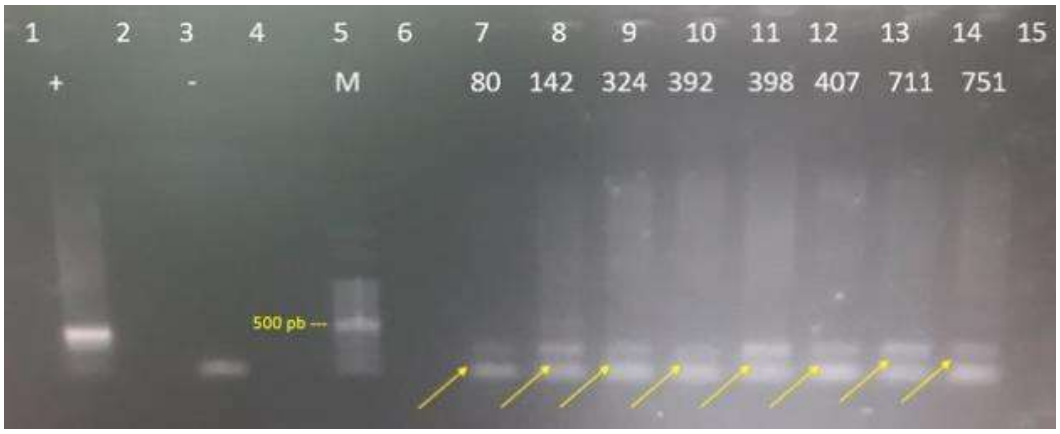


Figura 14: Amplificación de 8 muestras de tejido congelado de cáncer de mama en gel de agarosa al 1%. C-: control negativo, sin ADN. C+: Control positivo, con ADN de E. coli. Se evidencian 8 bandas del tamaño de interés señaladas en amarillo.

En la **Figura 15**, una corrida de 3 muestras nos dio como resultado 2 bandas de interés en las calles 6 y 7. La calidad de las imágenes se vio afectada, en este caso también, pero las bandas eran visibles incluso al utilizar el UV a la hora de cortar los geles.

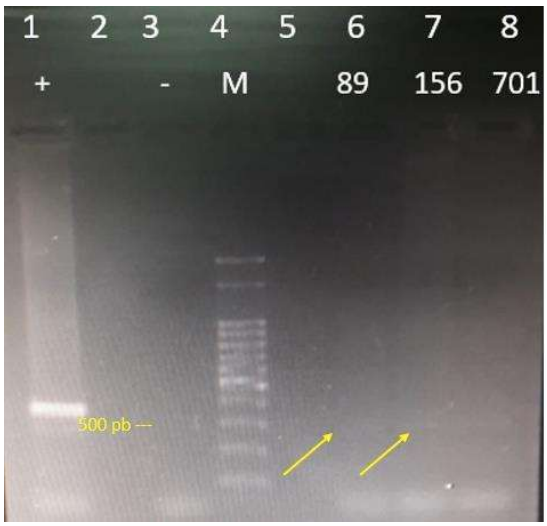


Figura 15: Amplificación de 3 muestras de tejido congelado de cáncer de mama en gel de agarosa al 1%. C-: control negativo, sin ADN. C+: Control positivo, con ADN de E. coli.

En la **Figura 16** podemos ver que se encontró fragmento de interés en todas las calles excepto la calle 10, 11, 13 y 14.

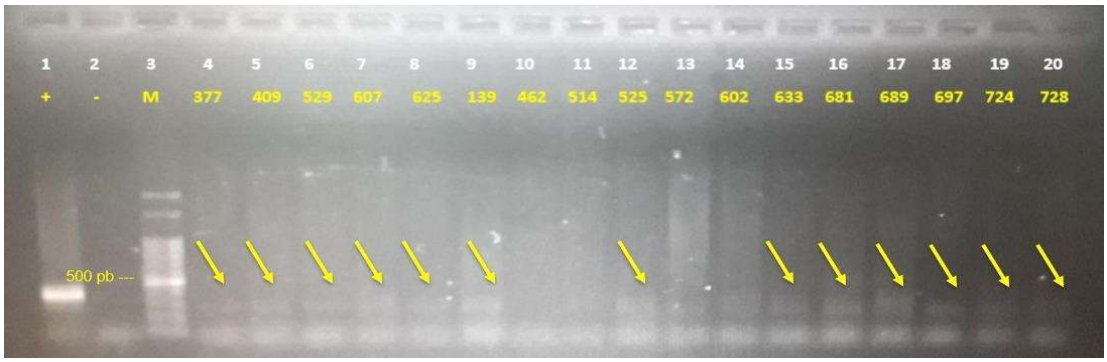


Figura 16: Amplificación de 17 muestras de tejido congelado de cáncer de mama en gel de agarosa al 1%. C-: control negativo, sin ADN. C+: Control positivo, con ADN de E. coli.

A continuación, en la **Figura 17**, se evidencia la banda de interés en todas las calles exceptuando la 6, la 8 y la 20 que dieron más tenue que el resto, por eso decidimos no utilizarlas.

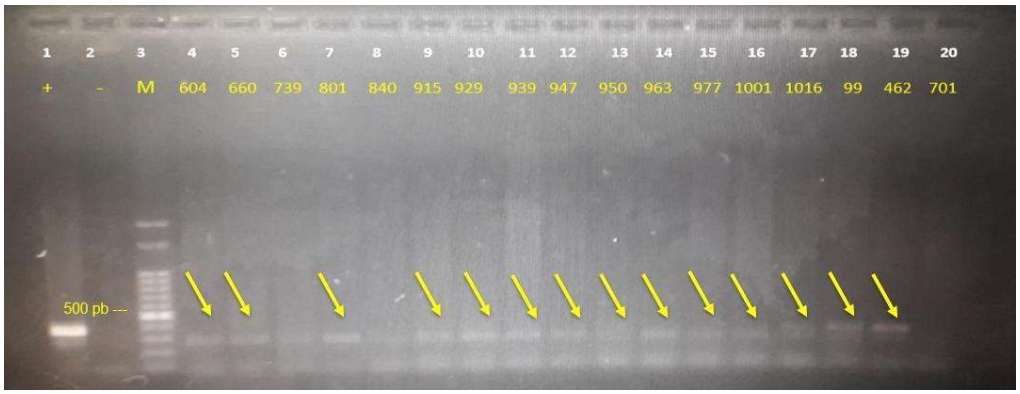


Figura 17: Amplificación de 17 muestras de tejido congelado de cáncer de mama en gel de agarosa al 1%. C-: control negativo, sin ADN. C+: Control positivo, con ADN de E. coli.

5.1.4. Purificación del ADN obtenido mediante PCR.

Las bandas que tenían el tamaño esperado (aproximadamente 358 pb), se cortaron bajo luz UV con lancetas estériles y se reservaron para su posterior purificación. Para tal fin se utilizó el EasyPure Quick Gel Extraction Kit (TGB-EF10101, TransGenBiotech).

La totalidad de las bandas de interés que conseguimos levantar fue de n=53, de las cuales la número 99 estaba repetida, por eso la cantidad total de muestras que se enviaron a Rosario para secuenciar fue de n=52. En Héritas tenían un sobrante de stock de 4 muestras de la investigación previa que se sumaron al nuevo lote, dando un total de n=56. Allí, hicieron un control de calidad previo a la secuenciación, una segunda amplificación por PCR, donde se buscó volver a amplificar todas las muestras y aquellas que dieran el fragmento de interés, serían potencialmente buenas para secuenciar. De un total de 56 muestras, 52 pasaron el control de calidad y estaban aptas para secuenciar.

Finalmente, para la secuenciación, se seleccionaron 22 muestras y se dejó al resto reservado por falta de presupuesto para el proyecto, el cual se seguirá en un futuro. Los resultados de la secuenciación de las 22 muestras los veremos a continuación.

5.2. Manipulación de datos genómicos.

5.2.1. Curva de rarefacción.

La curva de rarefacción es una herramienta importante para determinar si se han secuenciado suficientes muestras de un microbioma y sirve para evaluar la diversidad microbiana presente en la muestra. En la **Figura 18** podemos observar la curva de rarefacción empleada para la totalidad muestral de este trabajo.

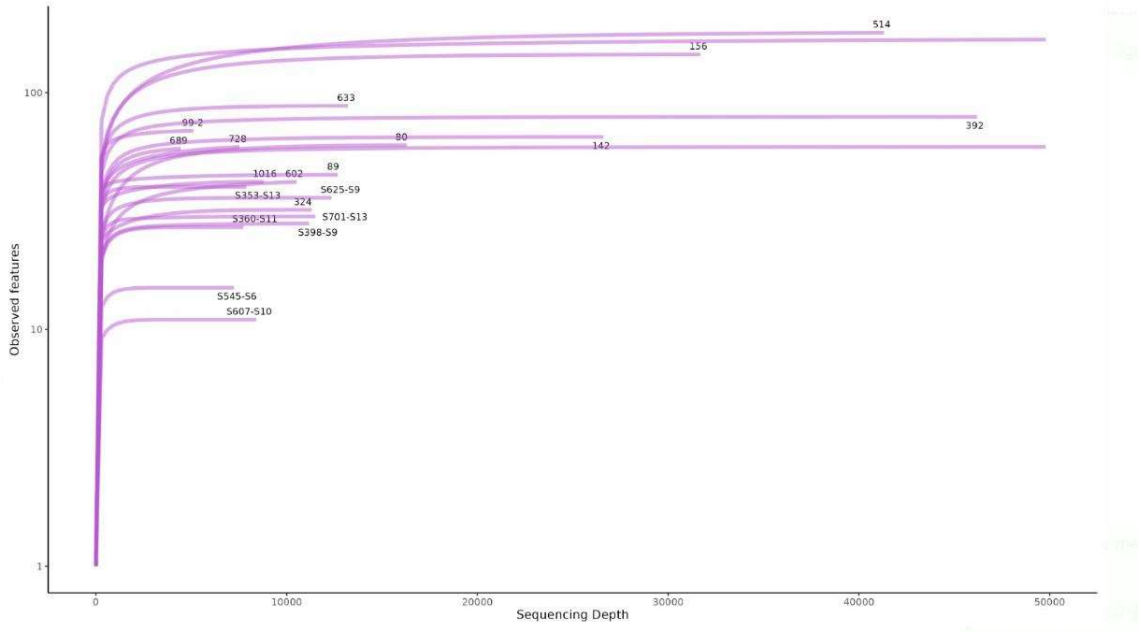


Figura 18: Curva de rarefacción de las 22 muestras secuenciadas. Se grafica el número de OTUs bacterianas presentes en las muestras de tejido tumoral mamario congelado.

En el eje de las ordenadas se representa la variabilidad por muestra y en el eje de las abscisas se representa la profundidad de la secuenciación. Se puede observar que con 1.000 lecturas por muestra es suficiente para realizar los análisis comparativos de diversidad y riqueza de especies al ser este valor donde se alcanza el plató.

5.2.2. Datos clínico-patológicos de las pacientes y estadística descriptiva.

Presentaremos a continuación el detalle de los datos clínico-patológicos de las pacientes cuyas muestras se secuenciaron para el análisis bioinformático. Las pacientes seleccionadas fueron 22, **Tabla IV** y **Tabla V.**

TABLA IV: Tabla con *scores* asignados a las 22 muestras secuenciadas para cada uno de los datos clínico-patológicos. En esta tabla encontramos edad, tamaño tumoral, KI-67, Her-2 neu, RE, RP, subtipo.

ID	Edad	Tamaño tumoral	Grado Histológico	KI-67	Her2-neu	Receptor estrógeno	Receptor progesterona	Subtipo
	<50 (0) / ≥50(1)	<2 (0) / ≥2(1)	1,2 o 3	<15 (0) / ≥15(1)	positivo (1) / negativo (0)	positivo (1) / negativo (0)	positivo (1) / negativo (0)	Luminal A (1)/ Luminal B(0). Sobre expresión(2)/ Triple basal (3)
89	1	1	3	1	1	1	0	0
142	1	0	2	0	0	1	1	1
156	1	1	2	1	0	1	0	1
324	0	1	1	0	0	1	1	1
99	1	1	3	1	0	1	0	1
392	0	1	1	1	0	1	1	1
339	1	1	3	1	1	1	1	0

353	1	0	3	1	1	1	1	0
360	1	0	1	1	0	1	1	1
398	1	1	1	1	0	1	1	1
433	1	1	2	1	0	1	1	1
545	1	0	2	1	1	1	1	0
607	1	1	2	1	0	1	1	1
625	1	1	3	1	0	1	1	1
701	1	1	3	1	0	1	1	1
80	1	0	3	1	0	0	0	3
514	1	1	1	1	1	1	1	0
602	0	1	1	1	0	1	1	1
633	0	1	2	1	0	1	1	1
689	1	1	2	1	0	0	0	3
728	1	1	2	1	1	1	0	0
1016	1	1	2	1	0	1	1	1

ID	**Ganglio**	**Tabaco**	**Alcohol**	**Metástasis**	**Muerte**	**Embarazo**	**Lactancia**	**Estado menstrual**
	positivo (1) / negativo (0)	**positivo (1) / negativo (0)**	**positivo (1) / negativo (0)**	**positivo (1) / negativo (0)**	**positivo (1) / negativo (0)**	**positivo (1) / negativo (0)**	**positivo (1) / negativo (0)**	**post-meno (1) / pre-meno (0)**
89	1	0	0	1	1	1	1	1
142	1	0	0	0	0	0	0	1
156	0	0	0	0	0	1	0	1
324	0	0	0	0	0	1	1	0
99	1	0	0	1	1	1	0	1
392	0	0	0	0	0	0	0	1
339	0	0	0	0	0	NA	NA	1
353	1	0	0	0	0	1	NA	1
360	1	0	0	0	0	1	1	1
398	0	0	1	0	0	1	1	1
433	1	0	0	0	0	1	1	1
545	0	0	0	0	0	0	0	1
607	1	1	0	1	0	1	1	1
625	1	0	0	1	0	1	1	1
701	1	0	0	1	1	1	1	1
80	0	0	0	0	0	1	1	1

514	1	1	0	0	0	1	1	1
602	0	0	1	0	0	1	1	0
633	1	0	0	0	0	1	1	0
689	0	0	0	0	0	1	0	1
728	1	1	0	1	0	1	1	1
1016	0	0	0	0	0	1	1	1

TABLA V: Tabla con *scores* asignados a las 22 muestras secuenciadas para cada uno de los datos clínico-patológicos. En esta tabla encontramos ganglio, tabaco, alcohol, metástasis, muerte, embarazo, lactancia, estado menstrual.

Los datos clínico-patológicos de ambas tablas se utilizaron para hacer todos los análisis bioinformáticos y estadísticos del proyecto.

Por su parte, a continuación, se presentan los datos en formato *barplot* para cada uno de los parámetros clínico-patológicos del cáncer de mama y estilo de vida de las pacientes, **figura 18** a **figura 21**, con el fin de poder ver la distribución de los datos en forma gráfica, dentro de cada grupo.

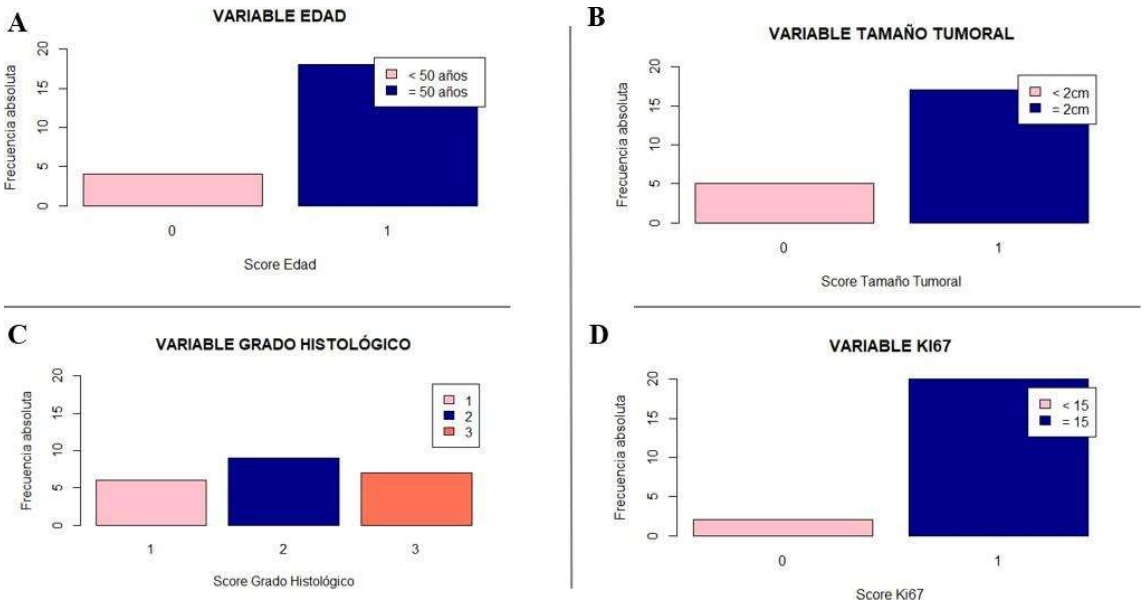


Figura 18: Gráficos de barra descriptivos generados con R Studio para las 22 muestras secuenciadas. En el eje de las abscisas vemos el score asignado y en el eje de las coordenadas la frecuencia absoluta de muestras. A: variable edad, B: variable tamaño tumoral, C: variable grado histológico, D: variable KI67.

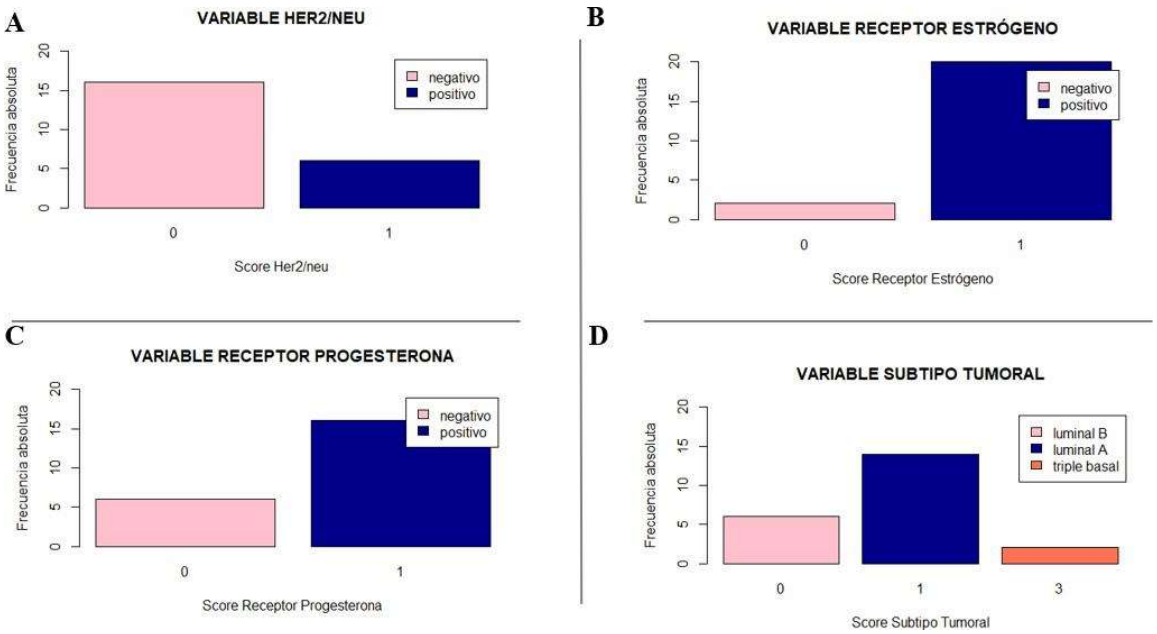


Figura 19: Gráficos de barra descriptivos generados con R Studio para las 22 muestras secuenciadas. En el eje de las abscisas vemos el score asignado y en el eje de las coordenadas la frecuencia absoluta de muestras. A: variable HER2/NEU, B: variable RE, C: variable RP, D: variable subtipo tumoral.

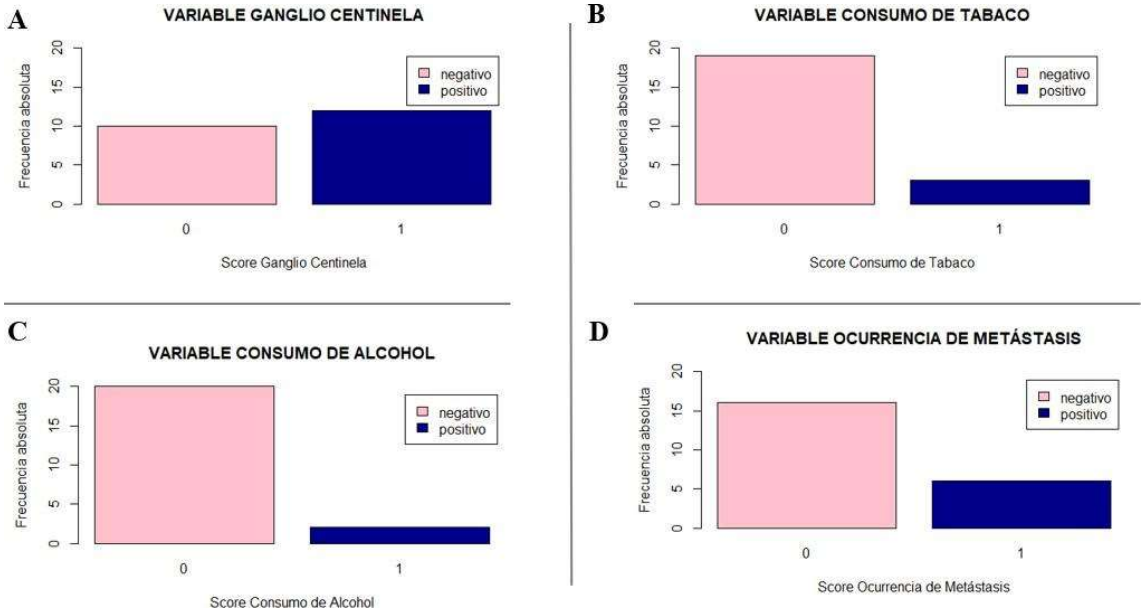


Figura 20: Gráficos de barra descriptivos generados con R Studio para las 22 muestras secuenciadas. En el eje de las abscisas vemos el score asignado y en el eje de las coordenadas la frecuencia absoluta de muestras. A: variable ganglio, B: variable tabaco, C: variable alcohol, D: variable metástasis.

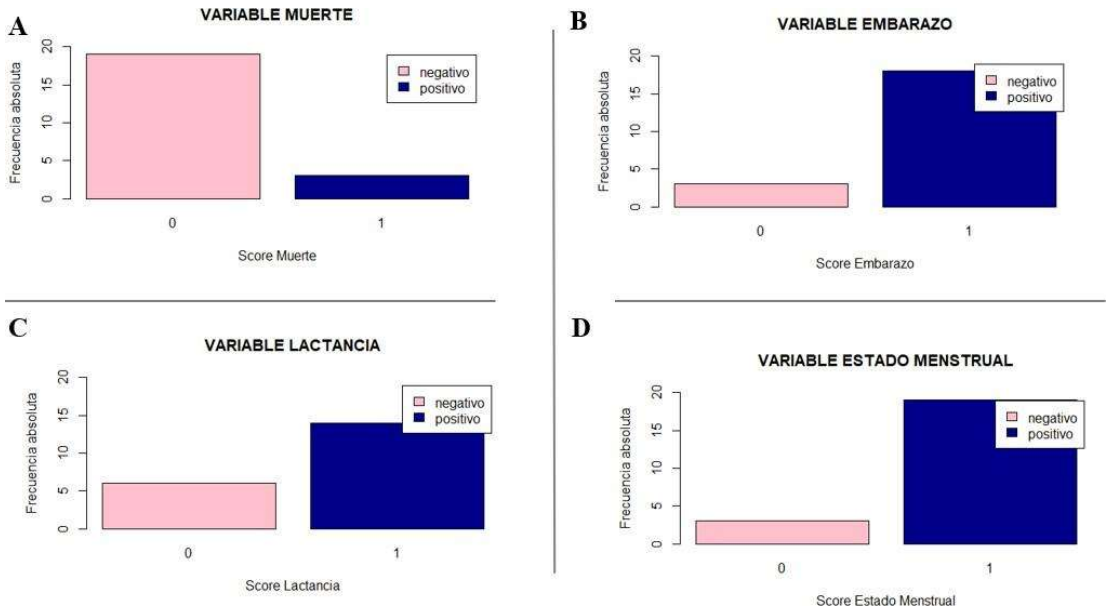


Figura 21: Gráficos de barra descriptivos generados con R Studio para las 22 muestras secuenciadas. En el eje de las abscisas vemos el score asignado y en el eje de las coordenadas la frecuencia absoluta de muestras. A: variable muerte, B: variable embarazo, C: variable lactancia, D: variable estado menstrual.

5.3. Clasificación OTU.

Los OTUs, se utilizan en la investigación del microbioma para clasificar y describir la diversidad bacteriana en una muestra. Luego, se pueden agrupar estas secuencias en OTUs basado en su similitud genética. Lo que sigue a continuación es la exposición de los gráficos de barra correspondientes a la abundancia relativa de los grupos taxonómicos obtenidos en cada muestra y para cada nivel taxonómico desde Filo hasta Género.

5.3.1. Distribución de Filo.

En la **Figura 22** tenemos la distribución en gráfico de barra a nivel Filo, y podemos observar que en nuestras muestras obtuvimos en mayor proporción, en orden decreciente, a los filos *Proteobacteria* (44.20%) y *Firmicutes* (23.22%) seguido de *Actinobacteriota* (11.00%) y *Bacteroidota* (9.44%). En la **TABLA VI** se encuentra el porcentaje de abundancia relativa para los filos más abundantes y la leyenda de estos.

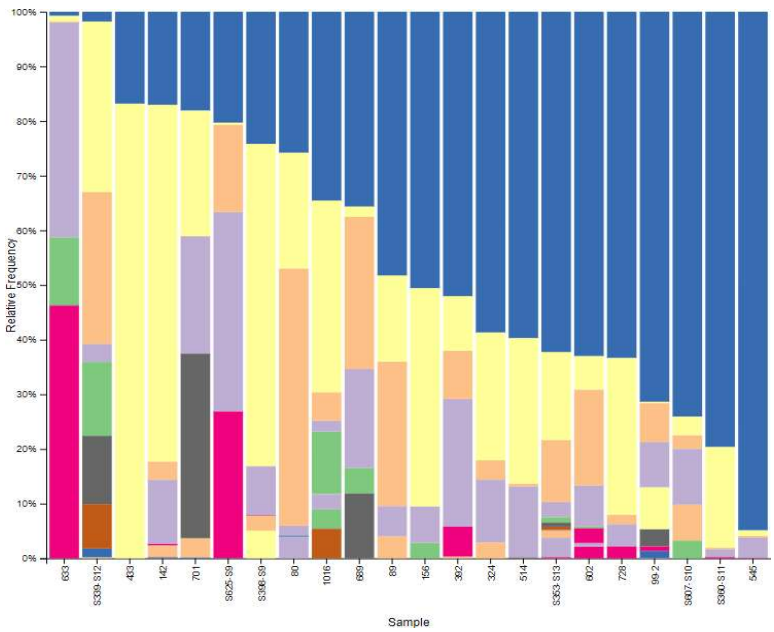


Figura 22: Abundancia relativa del grupo taxonómico a nivel Filo para las 22 muestras seleccionadas y procesadas.

TABLA VI: Detalle de las referencias para cada grupo taxonómico a nivel Filo con sus respectivos porcentajes de frecuencia relativa.

Leyenda	Taxonomía	%
	p_Proteobacteria,d_Bacteria	44,20%
	p_Firmicutes,d_Bacteria	23,22%
	p_Actinobacteriota,d_Bacteria	10,97%
	p_Bacteroidota,d_Bacteria	9,45%
	p_Chloroflexi,d_Bacteria	3,83%
	p_Campilobacterota,d_Bacteria	2,70%
	p_Fusobacteriota,d_Bacteria	1,96%
	p_Deinococcota,d_Bacteria	1,06%
	p_Verrucomicrobiota	0,49%
	p_Acidobacteriota,d_Bacteria	0,44%
	p_Synergistota,d_Bacteria	0,39%
	p_Planctomycetota,d_Bacteria	0,35%
	p_Myxococcota,d_Bacteria	0,25%
	p_Halobacterota,d_Bacteria	0,23%
	p_Patescibacteria,d_Bacteria	0,15%
	p_Armatimonadota,d_Bacteria	0,14%
	p_Desulfobacterota,d_Bacteria	0,09%
	p_Gemmatimonadota,d_Bacteria	0,07%
	p_Spirochaetota,d_Bacteria	0,01%
	p_Abditibacteriota,d_Bacteria	0,003%
	p_Halanaerobiaeota,d_Bacteria	0,001%

5.3.2. Distribución de Clase.

A nivel clase, podemos observar en la **Figura 23** que los grupos más representativos fueron *Gammaproteobacteria* (27,54%), *Bacilli* (17,52%), seguido por *Bacteroidia* y *Actinobacteria* (16,66% y 10,58% respectivamente). En la **TABLA VII** se encuentra el porcentaje de abundancia relativa para los filos más abundantes y la leyenda de estos.

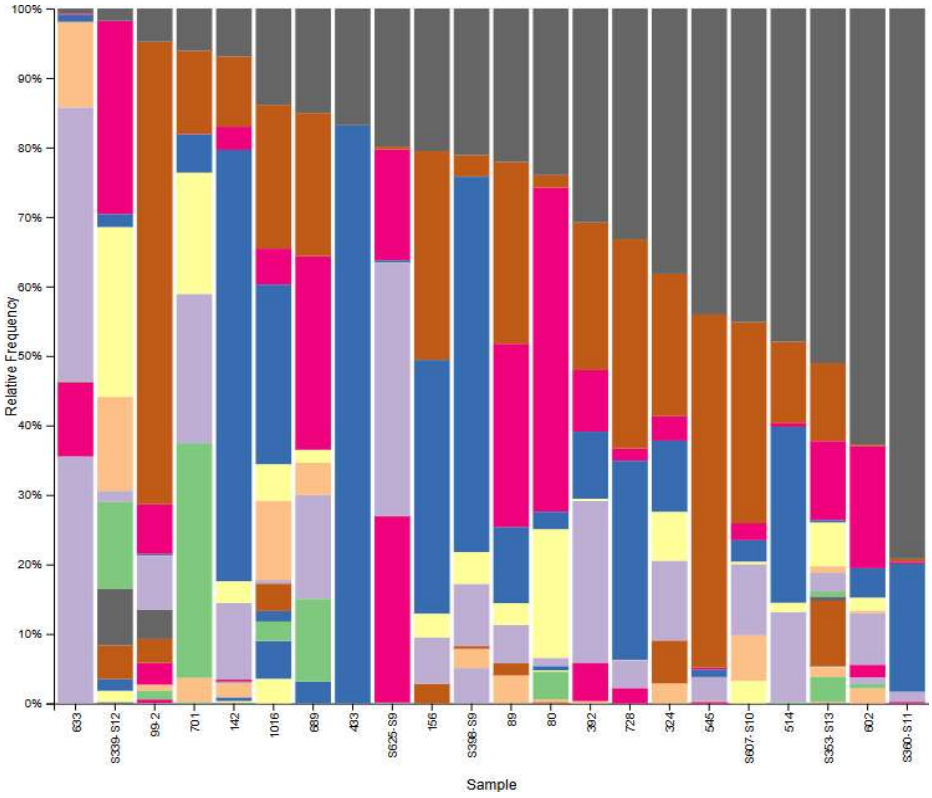


Figura 23: Abundancia relativa del grupo taxonómico a nivel Clase para las 22 muestras seleccionadas y procesadas.

TABLA VII: Detalle de las referencias para cada grupo taxonómico a nivel Clase con sus respectivos porcentajes de frecuencia relativa.

Leyenda	Taxonomía	%
	c_Gammaproteobacteria,d_Bacteria	27,54%
	c_Bacilli,d_Bacteria	17,52%
	c_Alphaproteobacteria,d_Bacteria	16,66%
	c_Actinobacteria,d_Bacteria	10,58%
	c_Bacteroidia,d_Bacteria	9,42%
	c_Clostridia,d_Bacteria	4,49%
	c_Campylobacteria,d_Bacteria	2,70%
	c_Chloroflexia,d_Bacteria	2,16%
	c_Fusobacteriia,d_Bacteria	1,96%
	c_Gitt-GS-136,d_Bacteria	1,66%
	c_Negativicutes,d_Bacteria	1,20%
	c_Deinococci,d_Bacteria	1,06%
	c_Verrucomicrobiae	0,49%

	c_Synergistia,d_Bacteria	0,39%
	c_Coriobacteriia,d_Bacteria	0,33%
	c_Blastocatellia,d_Bacteria	0,31%
	c_Polyangia,d_Bacteria	0,25%
	c_Halobacteria,d_Bacteria	0,23%
	c_Phycisphaerae,d_Bacteria	0,19%

5.3.3. Distribución de Orden.

A nivel de Orden tanto en la **Figura 24** como en la **TABLA VIII** , podemos observar con mayor dominancia *Pseudomonadales (13,01%), Burkholderiales (8,582%)* seguido por *Bacillales* (7,504%) y *Sphingomonadales* (7,263%).

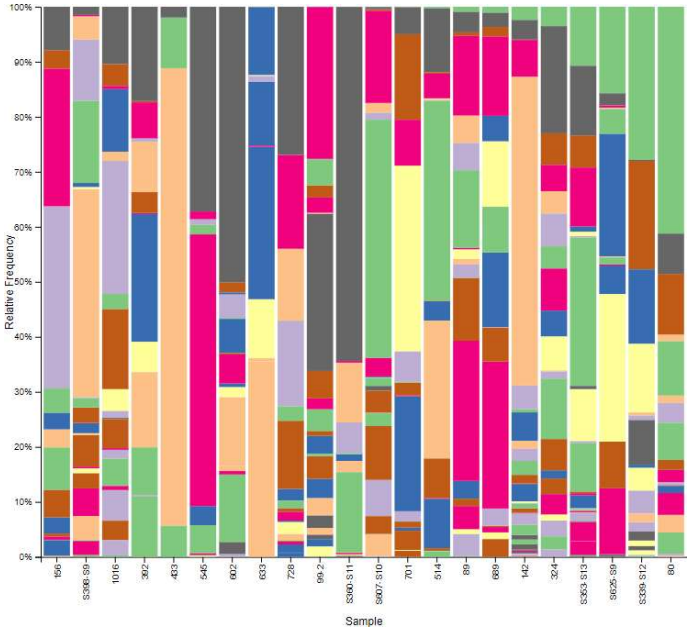


Figura 24: Abundancia relativa del grupo taxonómico a nivel Orden para las 22 muestras seleccionadas y procesadas.

TABLA VIII: Detalle de las referencias para cada grupo taxonómico a nivel Orden con sus respectivos porcentajes de frecuencia relativa.

Leyenda	Taxonomía	%
	o_Pseudomonadales,d_Bacteria	13,012%
	o_Burkholderiales,d_Bacteria	8,582%
	o_Bacillales,d_Bacteria	7,504%
	o_Sphingomonadales,d_Bacteria	7,263%
	o_Lactobacillales,d_Bacteria	5,439%

	o_Bacteroidales,d_Bacteria	4,723%
	o_Corynebacteriales,d_Bacteria	4,529%
	o_Staphylococcales,d_Bacteria	4,493%
	o_Micrococcales,d_Bacteria	3,721%
	o_Peptostreptococcales-Tissierellales,d_Bacteria	3,201%
	o_Enterobacterales,d_Bacteria	3,086%
	o_Flavobacteriales,d_Bacteria	2,974%
	o_Caulobacterales,d_Bacteria	2,894%
	o_Rhizobiales,d_Bacteria	2,824%
	o_Campylobacterales,d_Bacteria	2,701%
	o_Thermomicrobiales,d_Bacteria	2,164%
	o_Fusobacteriales,d_Bacteria	1,963%
	o_Gitt-GS-136,d_Bacteria	1,656%
	o_Propionibacteriales,d_Bacteria	1,435%

5.3.4. Distribución de Familia.

Al calcular las abundancias relativa en el nivel de familia, nos encontramos con mayor abundancia de los taxones; *Moraxellaceae* (10,53%), *Sphingomonadaceae* (7,263%) *Comamonadaceae* (6,179%) *Bacillaceae* (4,48%), tal como se refleja en la **Figura 25** y la **TABLA IX**.

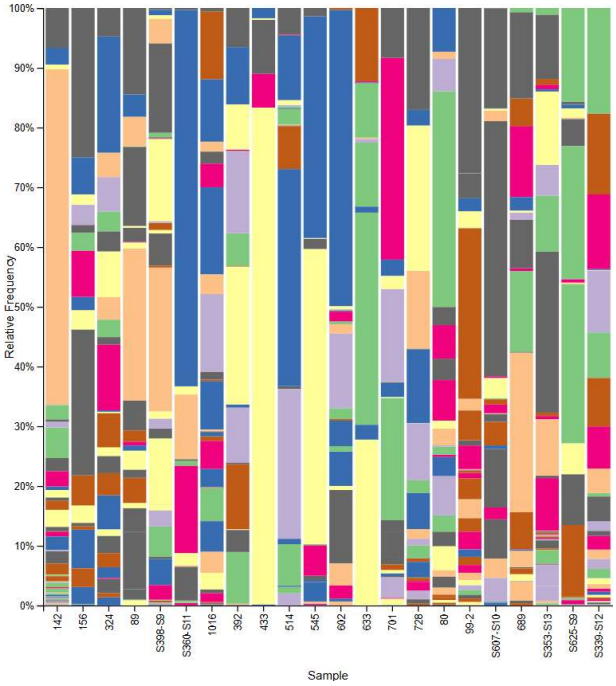


Figura 25: Abundancia relativa del grupo taxonómico a nivel Familia para las 22 muestras seleccionadas y procesadas.

TABLA IX: Detalle de las referencias para cada grupo taxonómico a nivel Familia con sus respectivos porcentajes de frecuencia relativa.

Leyenda	Taxonomía	%
f_Moraxellaceae,d_Bacteria		10,534%
f_Sphingomonadaceae,d_Bacteria		7,263%
f_Comamonadaceae,d_Bacteria		6,179%
f_Bacillaceae,d_Bacteria		4,832%
f_Staphylococcaceae,d_Bacteria		4,461%
f_Corynebacteriaceae,d_Bacteria		3,845%
f_Enterobacteriaceae,d_Bacteria		2,920%
f_Caulobacteraceae,d_Bacteria		2,894%
f_Weeksellaceae,d_Bacteria		2,765%
f_Campylobacteraceae,d_Bacteria		2,701%
f_Prevotellaceae,d_Bacteria		2,697%
f_Pseudomonadaceae,d_Bacteria		2,478%
f_Peptostreptococcales-Tissierellales,d_Bacteria		2,159%
f_JG30-KF-CM45,d_Bacteria		2,129%
f_Streptococcaceae,d_Bacteria		2,009%
f_Fusobacteriaceae,d_Bacteria		1,963%
f_Oxalobacteraceae,d_Bacteria		1,881%
f_Micrococcaceae,d_Bacteria		1,816%
f_Beijerinckiaceae,d_Bacteria		1,809%

5.3.5. Distribución de Género.

Por último, calculamos la abundancia relativa de los taxones a nivel de Género, encontrando con mayor abundancia a: Acinetobacter (6,25%), Bacillus (4.59%), Sphingomonas (4,58%) y Sphylococcus (4.44%) seguido de Moraxella (3.47%) y Alicycliphilus (3,20%). Esta información se evidencia e la **Figura 26** y la **TABLA V**.

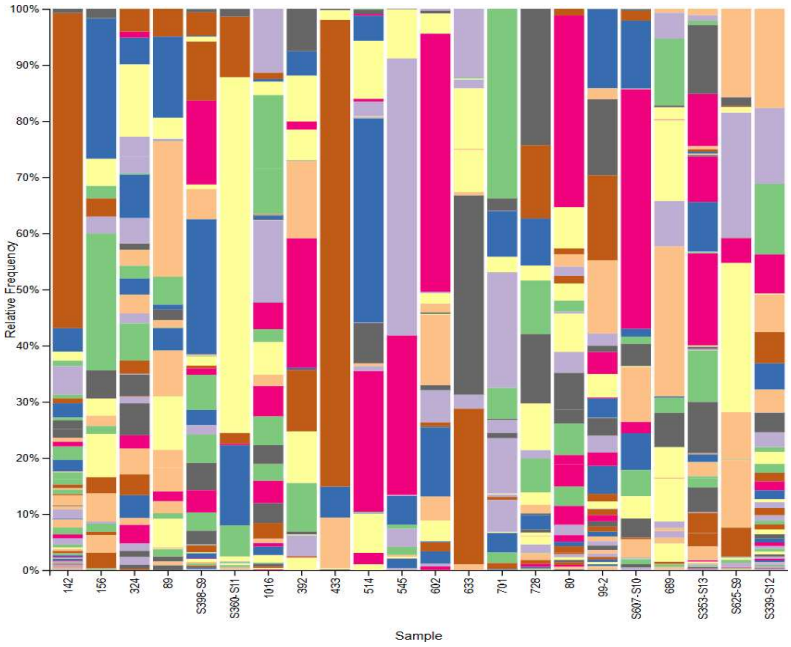


Figura 26: Abundancia relativa del grupo taxonómico a nivel Genero para las 22 muestras seleccionadas y procesadas.

TABLA V: Detalle de las referencias para cada grupo taxonómico a nivel de Genero con sus respectivos porcentajes de frecuencia relativa.

Leyenda	Taxonomía	%
	g_Acinetobacter,d_Bacteria	6,25%
	g_Bacillus,d_Bacteria	4,59%
	g_Sphingomonas,d_Bacteria	4,58%
	g_Staphylococcus,d_Bacteria	4,44%
	g_Moraxella,d_Bacteria	3,47%
	g_Alicycliphilus,d_Bacteria	3,20%
	g_Corynebacterium,d_Bacteria	2,97%
	g_Campylobacter,d_Bacteria	2,70%
	g_Cloacibacterium,d_Bacteria	2,67%
	g_Pseudomonas,d_Bacteria	2,48%
	g_Brevundimonas,d_Bacteria	2,43%
	g_Prevotella,d_Bacteria	2,36%
	g_JG30-KF-CM45,d_Bacteria	2,13%
	g_Escherichia-Shigella,d_Bacteria	2,06%

	g_Streptococcus,d_Bacteria	2,01%
	g_Fusobacterium,d_Bacteria	1,96%
	g_Massilia,d_Bacteria	1,85%
	g_Gitt-GS-136,d_Bacteria	1,66%
	g_Porphyromonas,d_Bacteria	1,61%

5.4. Análisis de la diversidad.

5.4.1. Análisis de la diversidad alfa.

La diversidad alfa es una medida de la diversidad biológica que se refiere a la variedad y riqueza de especies en un ecosistema o en una comunidad biológica determinada. Se utiliza para comparar la diversidad entre diferentes comunidades o ecosistemas. Es una medida importante porque la diversidad de especies en un ecosistema es un indicador de su salud y resiliencia. Además, una mayor diversidad de especies en un ecosistema también puede ser un indicador de una mayor capacidad para resistir perturbaciones y para mantener su funcionamiento a largo plazo.

Para estudiar la diversidad *alfa,* se utilizan 3 tipos de índices:

Chao 1: El índice Chao1 es una métrica utilizada en el análisis de datos de microbioma para estimar la diversidad de especies o individuos en una muestra. Este índice se calcula a partir de la abundancia de cada especie en una muestra y del número de especies raras (es decir, aquellas que se encuentran en una sola muestra). Este índice se utiliza comúnmente para comparar la diversidad de especies entre diferentes muestras.

***Evenness*:** El índice de equidad (o evenness en inglés) es otra métrica utilizada en el análisis de datos de microbioma que describe la distribución de abundancia de las diferentes especies presentes en una muestra. Este índice mide la uniformidad con la que las especies están representadas en una muestra, es decir, cuán equitativamente se distribuyen las abundancias entre las diferentes especies. Este índice se calcula a partir de la diversidad de especies en una muestra y de la distribución de abundancia de cada especie en la muestra. Un índice de equidad alto indica que todas las especies están representadas de manera uniforme, mientras que un índice bajo indica que algunas especies están muy abundantes y otras están poco representadas.

Shannon: es una métrica cuantitativa comúnmente utilizada en el análisis de datos de microbioma para cuantificar la diversidad de especies presentes en una muestra. Este índice tiene en cuenta tanto el número de especies presentes en una muestra como su abundancia relativa. Se calcula a partir de la proporción de cada especie en una muestra y su logaritmo natural. Este índice toma en cuenta tanto la riqueza de especies como su equidad, y es sensible tanto a la presencia de especies raras como a la presencia de especies dominantes.

A continuación, mostraremos los resultados de los 3 índices analizados para cada uno de los parámetros clínico-patológicos estudiados en este proyecto dentro de las 22 muestras secuenciadas. Lo que veremos es el análisis de OTUs en cada una de las variables, desde la **Figura 27a** hasta la **Figura 27o**.

Cabe mencionar que se encontró significancia estadística para el índice *Eveness* en la variable “ganglio centinela”, observando un valor de p value = 0,05 (**Figura 27h**) y un valor de p value = 0,026 en “receptor progesterona” (**Figura 27f**).

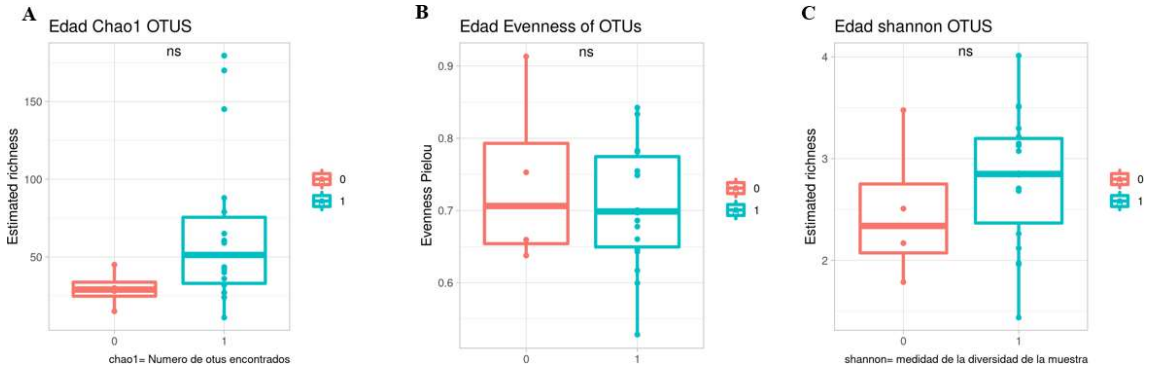


Figura 27a: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "edad", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness C: Índice Shannon. Referencia score 0: <50 años, 1: ≥ 50 años.

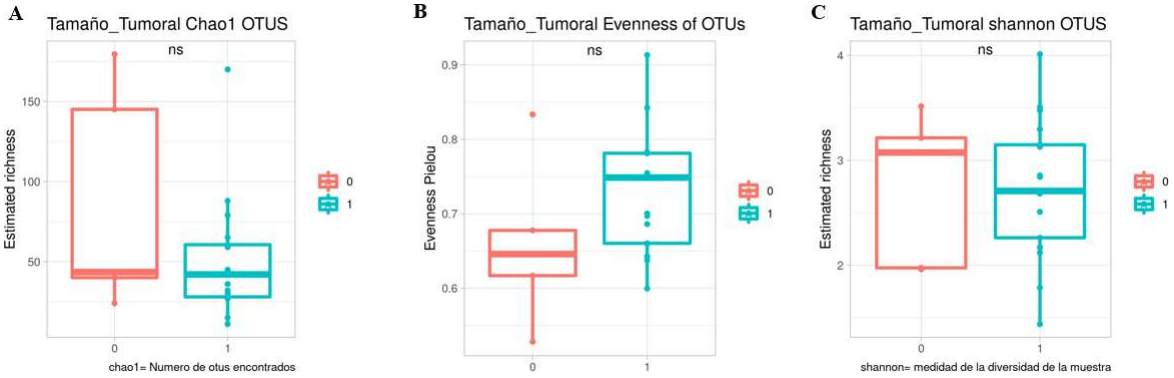


Figura 27b: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "tamaño tumoral", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness C: Índice Shannon. Referencia score 0: < 2, 1: ≥ 2.

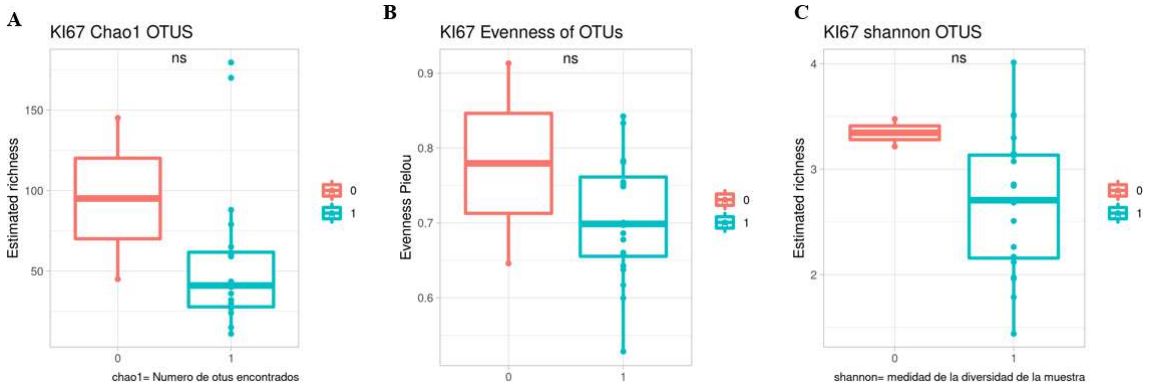


Figura 27c: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "Ki67", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness C: Índice Shannon. Referencia score 0: < 15 y 1: ≥15.

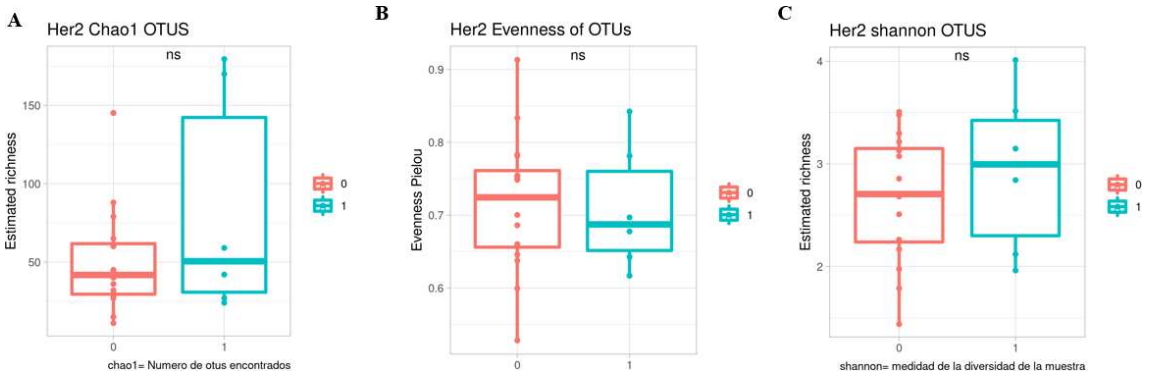


Figura 27d: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "Her2/neu", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness C: Índice Shannon. Referencia score 0: negativo y 1: positivo.

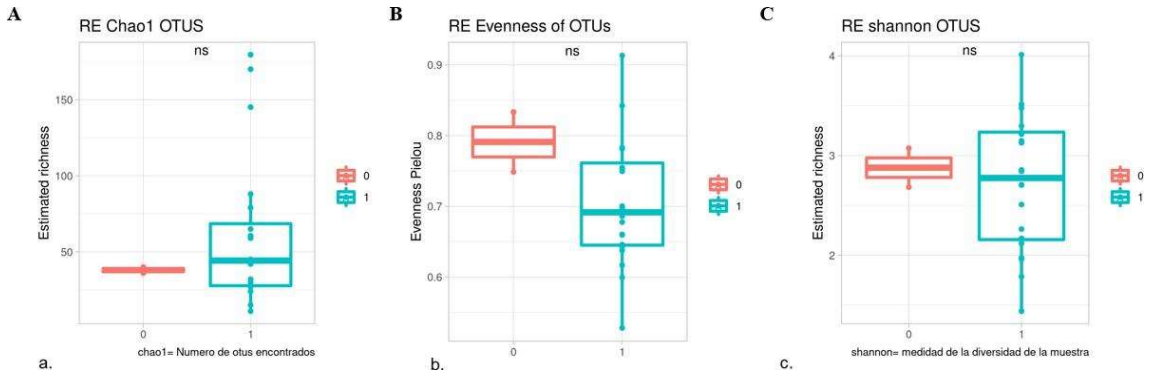


Figura 27e: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "receptor estrógeno", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness C: Índice Shannon. Referencia score 0: negativo y 1: positivo.

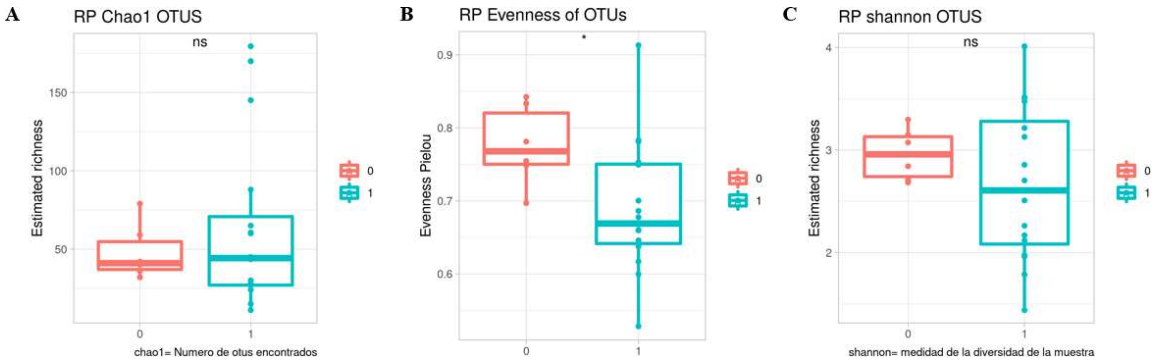


Figura 27f: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "receptor progesterona", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness C: Índice Shannon. Referencia score 0: negativo y 1: positivo.

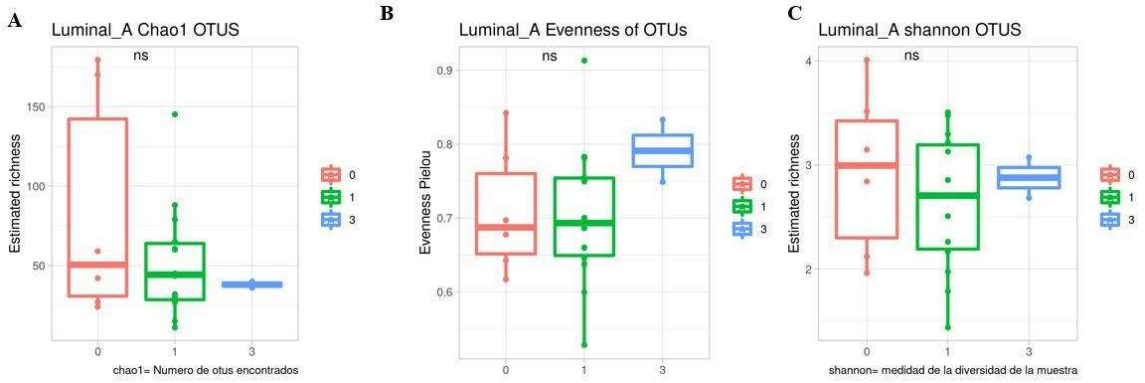


Figura 27g: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "subtipo tumoral", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness C: Índice Shannon. Referencia score 0: Luminal B, 1: Luminal A, 2: Sobre expresión, 3: Triple basal.

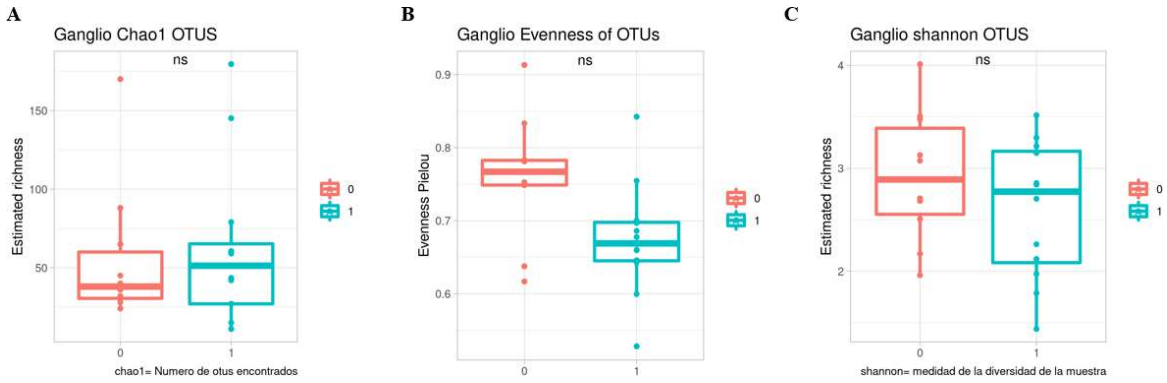


Figura 27h: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "ganglio centinela", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness, C: Índice Shannon. Referencia score 0: negativo, 1: positivo.

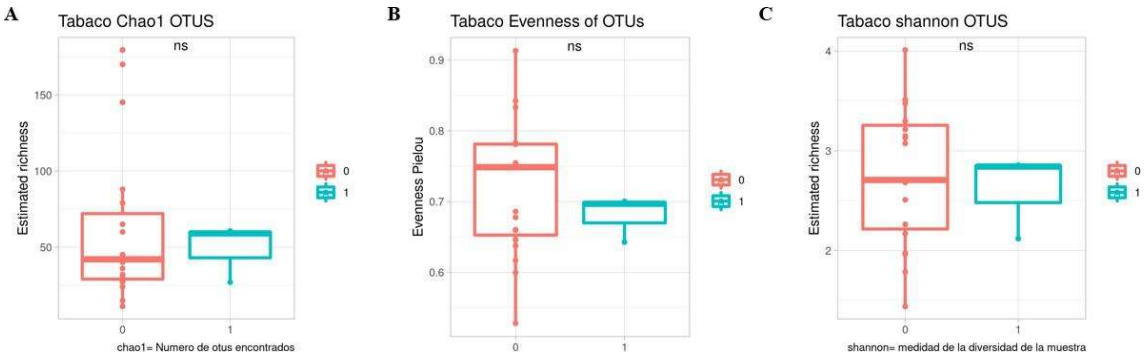


Figura 27i: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "consumo de tabaco", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness, C: Índice Shannon. Referencia score 0: negativo, 1: positivo.

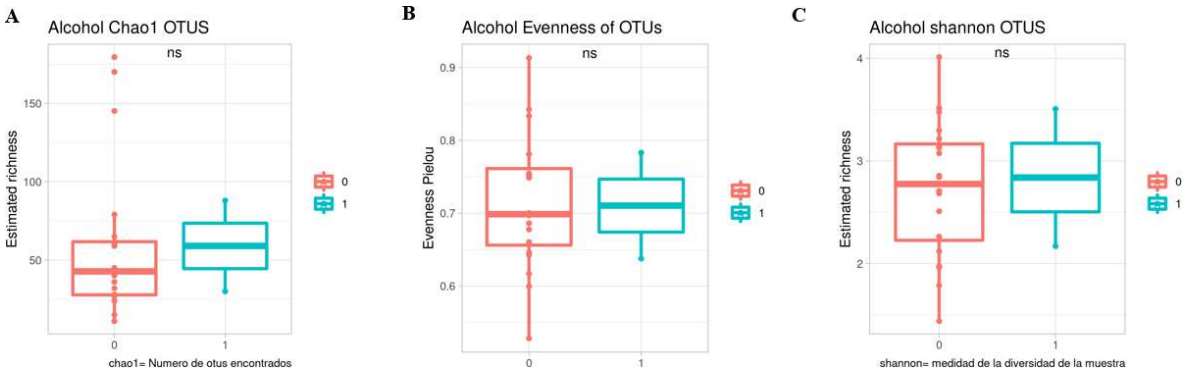


Figura 27j: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "consumo de alcohol", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness, C: Índice Shannon. Referencia score 0: negativo, 1: positivo.

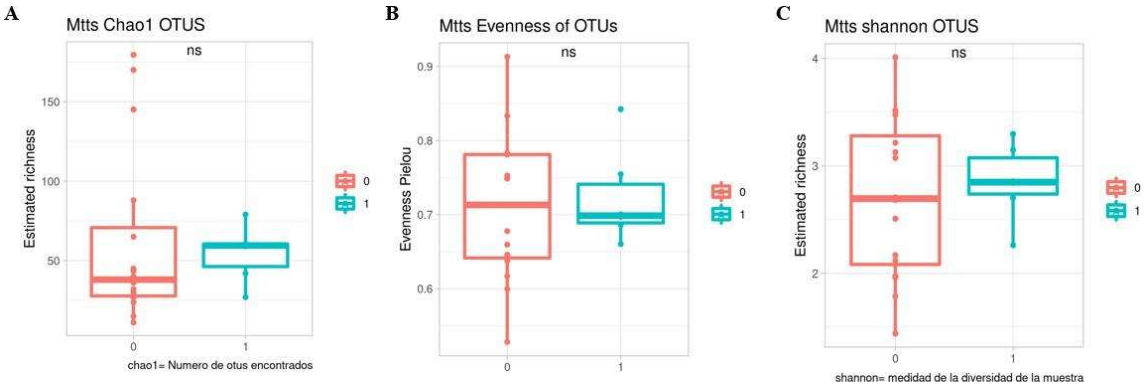


Figura 27k: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "metástasis", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness, C: Índice Shannon. Referencia score 0: negativo, 1: positivo.

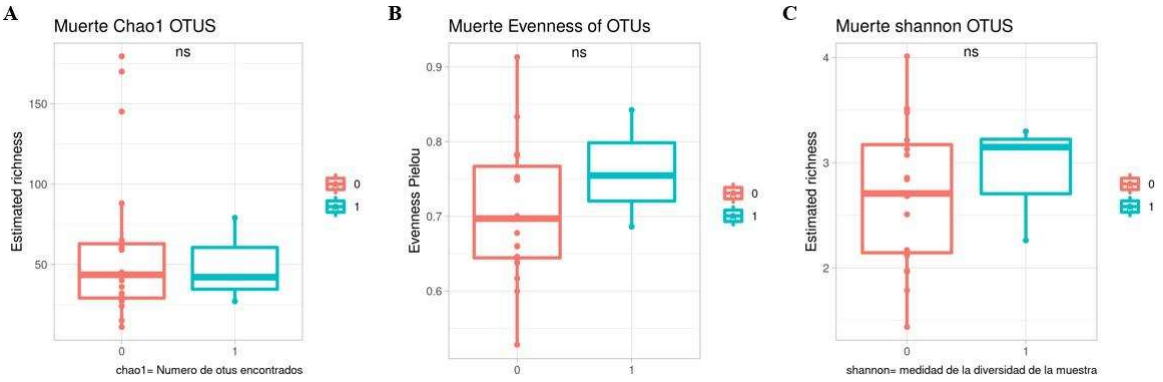


Figura 27l: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "muerte", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness, C: Índice Shannon. Referencia score 0: negativo, 1: positivo.

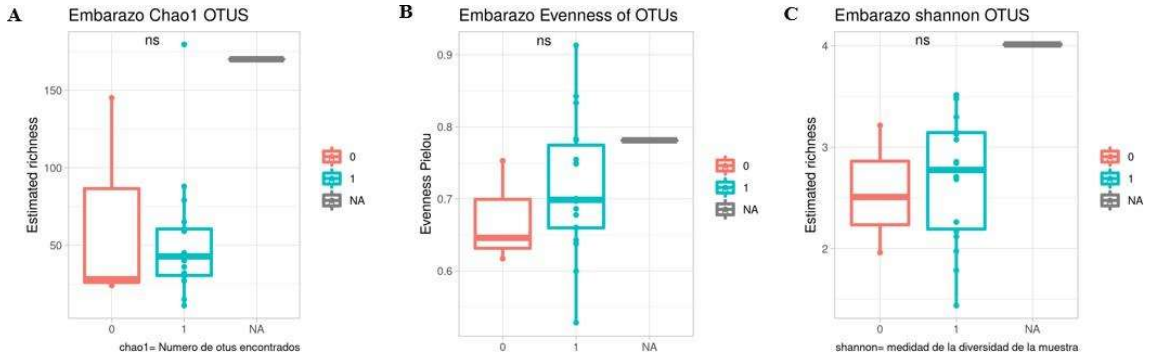


Figura 27m: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "embarazo", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness, C: Índice Shannon. Referencia score 0: negativo, 1: positivo.

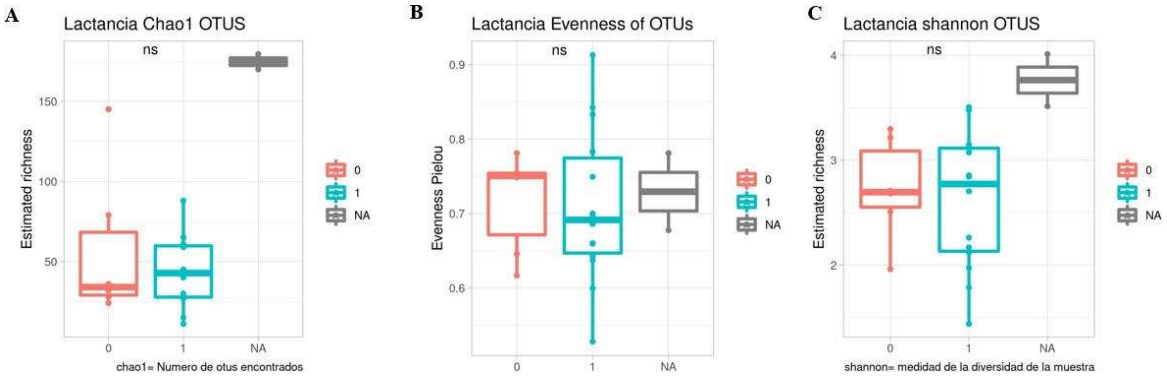


Figura 27n: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "lactancia", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness, C: Índice Shannon. Referencia score 0: negativo, 1: positivo.

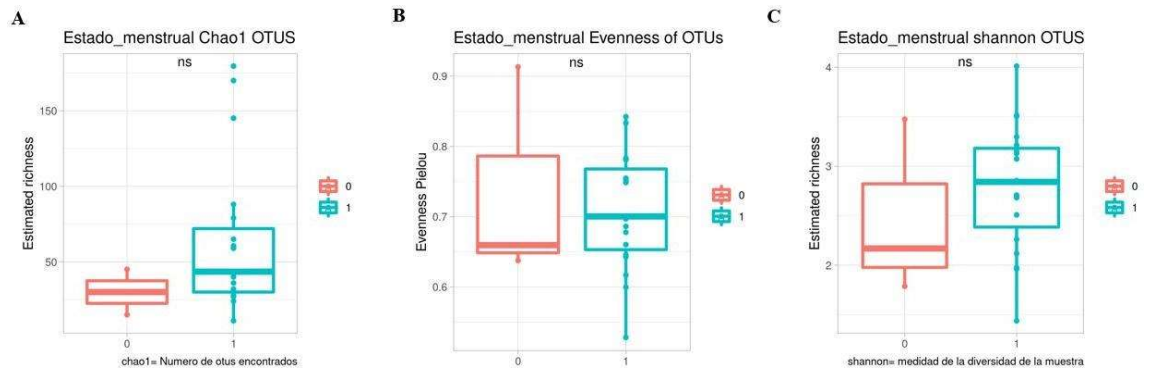


Figura 27o: Boxplot de la Diversidad alfa según el parámetro de "estado menstrual", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado. A: Índice Chao1, B: Índice Eveness, C: Índice Shannon. Referencia score 0: premenopáusico, 1: postmenopáusico.

5.4.2. Análisis de la composición bacteriana agrupando las muestras según los parámetros clínico-patológicos estudiados.

Mediante el empleo del software STAMP, se logró llevar a cabo el análisis estadístico con el propósito de identificar las discrepancias notables entre los distintos niveles taxonómicos al agrupar las muestras en las variables analizadas. Se utilizó la *prueba t* no paramétrica de White, que posibilita la comparación de perfiles organizados en dos grupos. Al emplear este método estadístico para la comparación de las muestras, se obtuvieron diferencias significativas cuyos valores de *p* fueron inferiores a 0,05. Los resultados se encuentran representados en los gráficos que se muestran a continuación.
Es relevante mencionar que para los fines de este trabajo decidimos mostrar lo que sucede al seguir analizando los parámetros donde encontramos significancia relativa de la diversidad alfa; "ganglio centinela" y "receptor progesterona". También decidimos entrar en detalle en algunas significancias estadísticas que encontramos al analizar los parámetros de evolución tumoral, en este caso "metástasis" y "muerte", ya que es de interés para el proyecto.

En la **Figura 28**, tenemos la representación gráfica del análisis de la abundancia relativa de los taxones según el parámetro de "ganglio centinela". Dividiendo en los grupos ganglio positivo y negativo, pudimos encontrar diferencias significativas en las abundancias relativas de los filos *Abditibacteriota*, *Gemmatimonadota* (más abundante en Ganglio +, p=0,040) y *Halobacteriota* (más abundante en ganglio negativo con un p=9,99E-4).

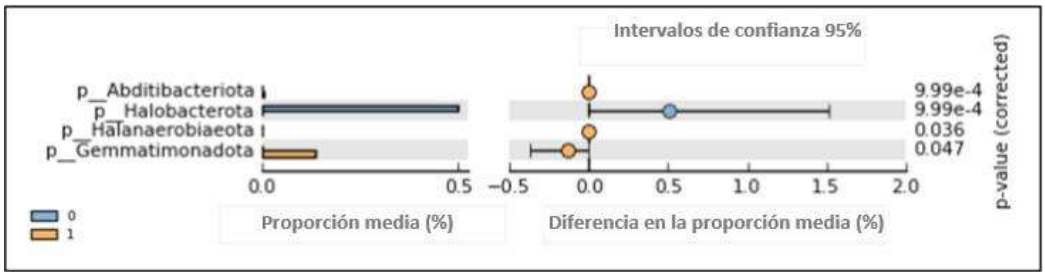


Figura 28: Diagrama de barra de error extendido que muestra la diferencia en la abundancia relativa de los grupos taxonómicos que presentaron diferencias significativas entre los pacientes de cáncer de mama con ganglio centinela positivo y ganglio centinela negativo a nivel de filo. 0: negativo, 1: positivo.

Nos pareció relevante hacer un análisis de los filos más representados en este caso, *Halobacteriota* y *Gemmatimonadota.* Para el primer caso, nos encontramos con que el taxón estaba más representado en el grupo de ganglio negativo, aunque en mayor abundancia para la muestra 398. Para el caso del segundo taxón pudimos observar que se encontraba en mayor abundancia dentro del grupo de ganglio positivo y representado en 4 muestras, 142, 701, 99 y 625. Esto se evidencia en la **Figura 29**.

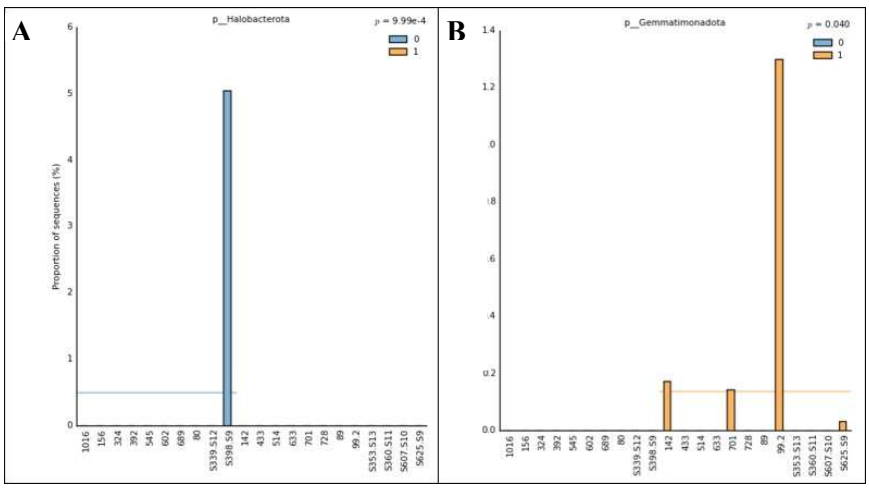


Figura 29: *Bar plot* que muestra la distribución de los filos *Halobacteriota* (A) Y *Gematimonadota* (B) para las 22 muestras, sobre el parámetro "ganglio centinela". 0: negativo, 1: positivo.

Cuando realizamos el mismo análisis, pero a nivel de género, obtuvimos una amplia lista de taxones representados en mayor o menor medida, sin embargo, el género *Peptoniphilus,* **Figura 30**, estaba mejor representado en el grupo con ganglio negativo en comparación con el grupo de ganglio positivo.

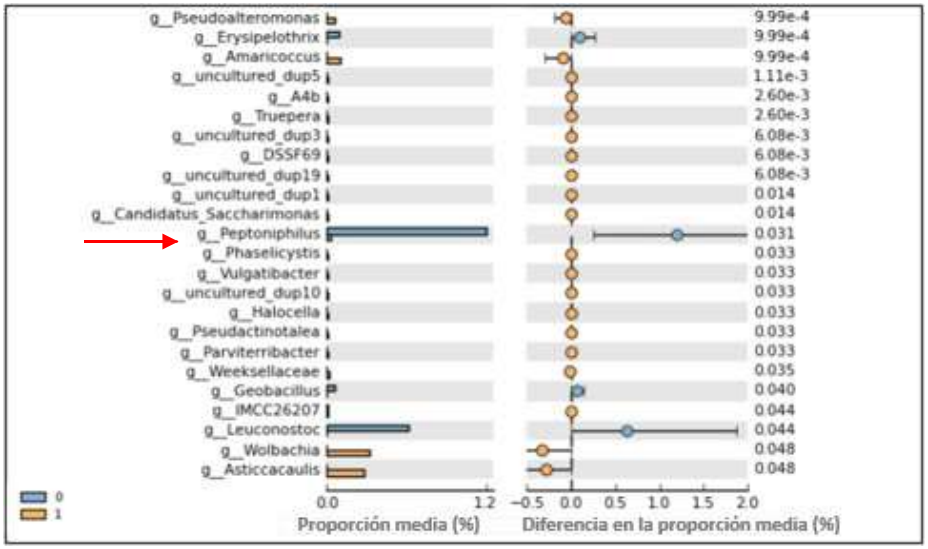


Figura 30: Diagrama de barra de error extendido que muestra la diferencia en la abundancia relativa de los grupos taxonómicos que presentaron diferencias significativas entre los pacientes de cáncer de mama con ganglio centinela positivo y ganglio centinela negativo a nivel de género. 0: negativo, 1: positivo.

Dada la significancia, quisimos evaluar cuales eran las muestras dentro del grupo de ganglio negativo que tenían más representado al género *Peptoniphilus*. Para tal fin realizamos un *bar-plot* y pudimos encontrar 4 muestras con dicho género en mayor abundancia en el grupo negativo. Las muestras mencionadas son la 156, 324, 80 y 339 en la **Figura 31**.

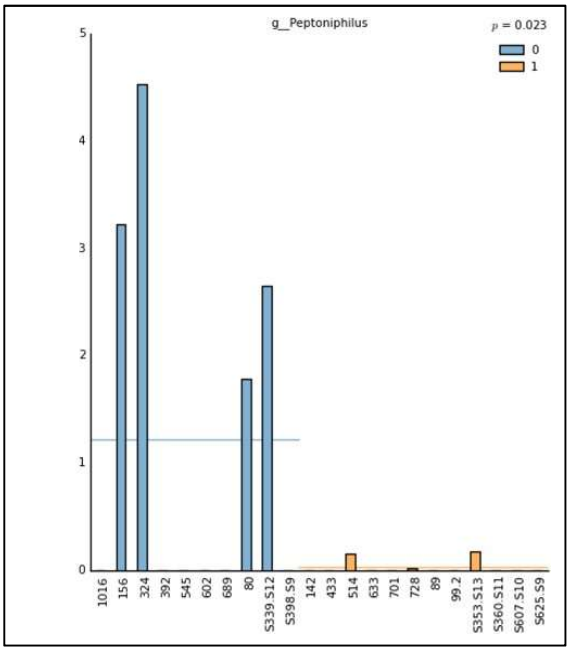


Figura 31: *Bar plot* que muestra la distribución del género *Peptoniphilus* para las 22 muestras, sobre el parámetro "ganglio centinela". 0: negativo, 1: positivo.

A continuación, exponemos el análisis hecho con el parámetro "receptor progesterona" donde encontramos un solo filo (*Bacteroidota*) con significancia estadística al comparar el grupo positivo con el negativo, **Figura 32.**

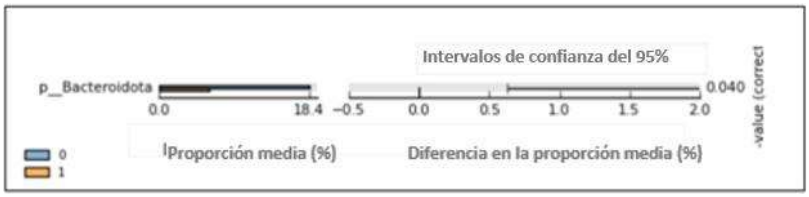


Figura 32: Diagrama de barra de error extendido que muestra la diferencia en la abundancia relativa de los grupos taxonómicos que presentaron diferencias significativas entre los pacientes de cáncer de mama con RP+ y RP- nivel de filo. 0: negativo, 1: positivo.

Para estudiar la distribución de este filo en cada uno de los grupos, hicimos nuevamente un *bar-plot*, **Figura 33**, donde se puede ver que es un filo bien representado en una gran cantidad de muestras, sin embargo, en el grupo RP- se encuentra en mayor abundancia para las muestras 689, 80 y 89.

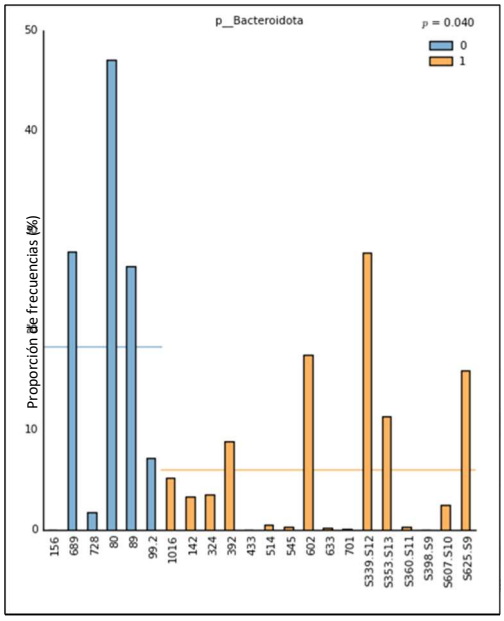


Figura 33: *Bar plot* que muestra la distribución del filo *Bacteroidota* para las 22 muestras, sobre el parámetro "ganglio centinela". 0: negativo, 1: positivo.

Asimismo, el análisis a nivel de género nos arrojó 25 taxones con relevancia estadística.

En la **Figura 34** podemos ver el diagrama que lo evidencia.

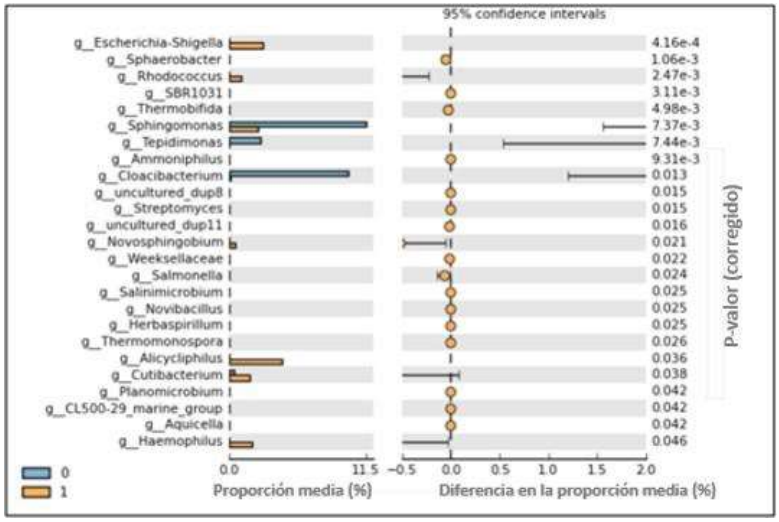


Figura 34: Diagrama de barra de error extendido que muestra la diferencia en la abundancia relativa de los grupos taxonómicos que presentaron diferencias significativas entre los pacientes de cáncer de mama con RP+ y RP- a nivel de género. 0: negativo, 1: positivo.

En la **Figura 35** A, B y C, podemos ver la distribución de los géneros entre los grupos con RP+ y RP-. Se puede observar que *Escherichia shigella* está muy bien representada en pacientes con RP+, pero en aquellas con RP- el género *Sphingomonas* se ve mayormente representado. Además, tenemos 2 muestras con *Cloacibacterium* muy expresada, lo cual podría suponer alguna contaminación ya que es un género que se encuentra en el agua.

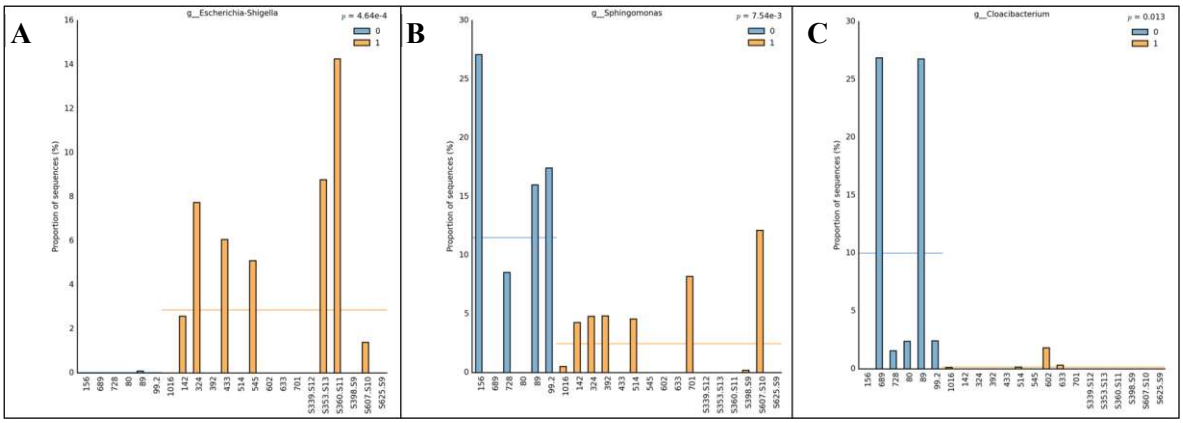


Figura 35: *Bar plot* que muestra la distribución del género *Sphingomonas* para las 22 muestras, sobre el parámetro "receptor progesterona". 0: negativo, 1: positivo.

Para los fines de este trabajo resultaba de gran importancia hacer un análisis de la evolución tumoral de las pacientes, estudiando el parámetro "metástasis" y "muerte". En ese marco, analizamos los grupos taxonómicos (**Figura 36**), para el parámetro de metástasis y encontramos como filos con mayor diferencia significativa en abundancia relativa y entre ambos grupos (con y sin metástasis) a *Fusobacteriota, Firmicutes* y *Verrucomicrobiota*, siendo el más representativo *Firmicutes.*

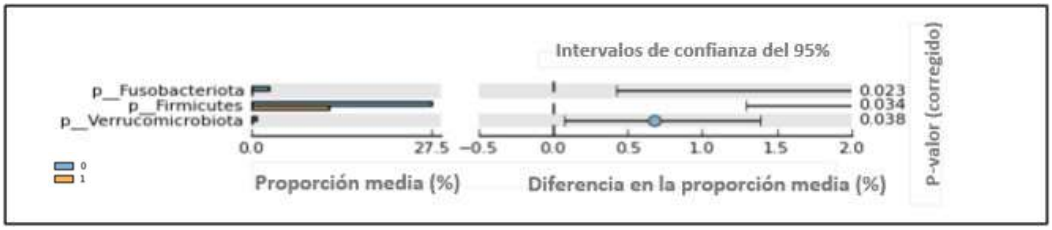


Figura 36: Diagrama de barra de error extendido que muestra la diferencia en la abundancia relativa de los grupos taxonómicos que presentaron diferencias significativas entre los pacientes de cáncer de mama con y sin metástasis a nivel de filo. 0: negativo, 1: positivo.

En la **Figura 37** A, B y C, podemos ver la distribución de estos filos entre los grupos con y sin metástasis. Se puede observar que *Firmicutes* está muy bien representado en gran parte de las pacientes, pero en aquellas sin metástasis se ve mayormente representado. Asimismo, *Fusobacteriota* es abundante en 6 muestras del grupo negativo y *Verrucumicrobiota* en 4 del mismo grupo.

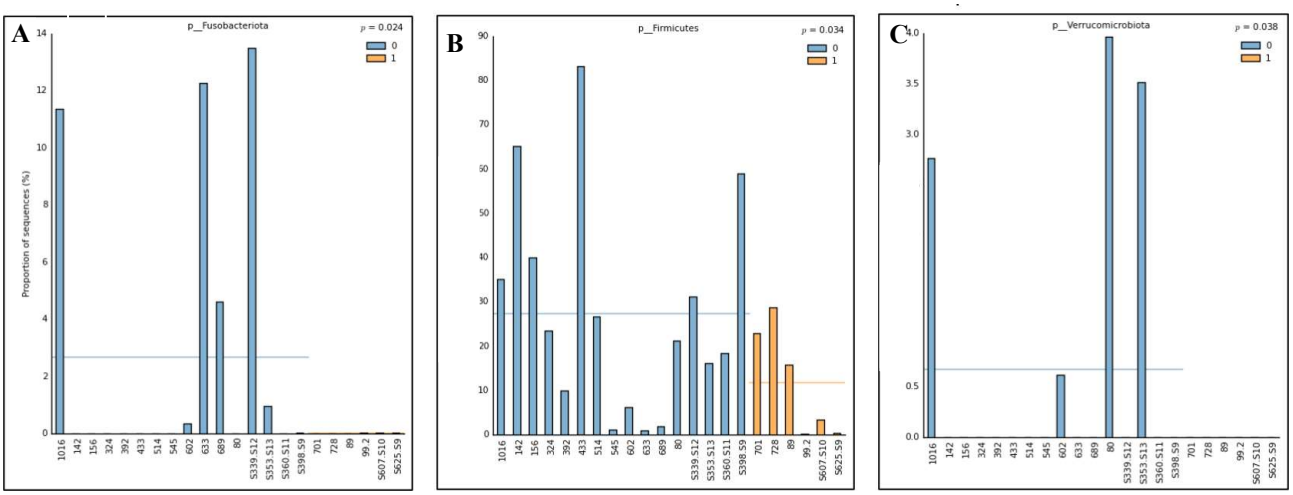


Figura 37: *Bar plot* que muestra la distribución de los filos *Fusobacteriota* (A), *Firmicutes* (B), *Verrucumicrobiota* (C) para las 22 muestras, sobre el parámetro "metástasis". 0: negativo, 1: positivo.

Sphingomonas fue el género más representado en ambos grupos y presentó diferencias significativas en abundancia relativa entre el grupo de pacientes con y sin metástasis, seguido por *Acinetobacter*, *Fusobacterium, Escherichia-Shigella, Haemophilus* y otros, **Figura 38.**

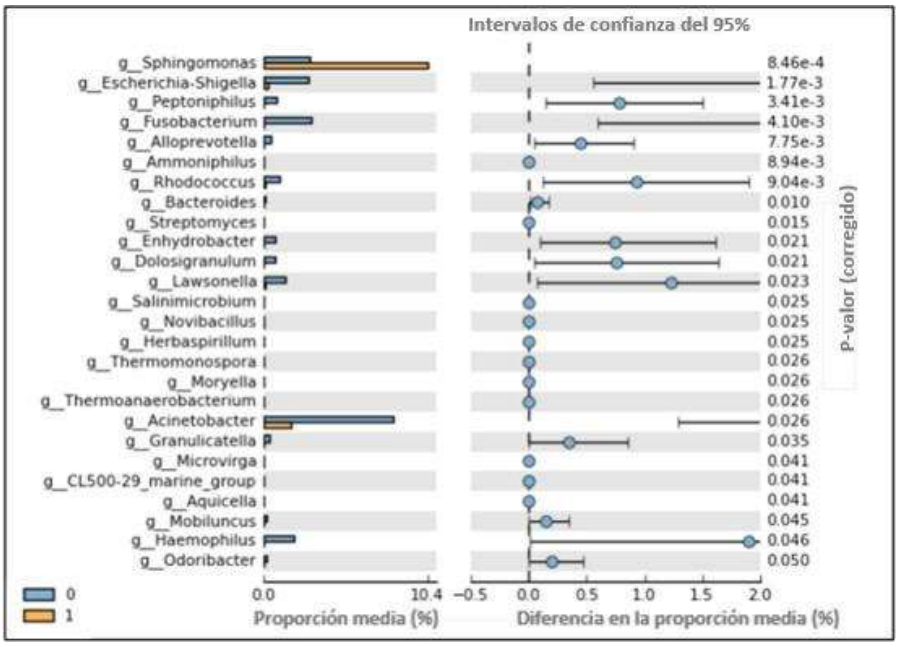


Figura 38: Diagrama de barra de error extendido que muestra la diferencia en la abundancia relativa de los grupos taxonómicos que presentaron diferencias significativas entre los pacientes de cáncer de mama con y sin metástasis a nivel de filo. 0: negativo, 1: positivo.

A continuación, veremos la distribución de los géneros más representativos para este grupo en la **Figura 39**, para *Sphingomonas*, *Acinetobacter* y *Fusobacterium*. El primero se encuentra mejor representado en el grupo de pacientes con metástasis (**Figura 39 A**) y los otros 2 géneros mencionados se encuentran en mayor abundancia para las muestras del grupo sin metástasis (**Figura 39 B** y **39 C**).

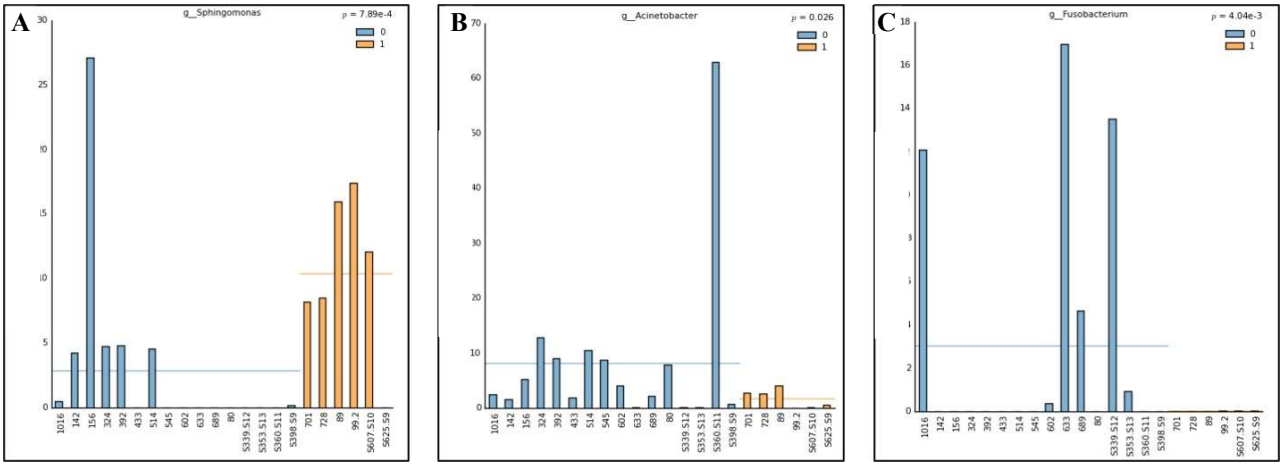


Figura 39: *Bar plot* que muestra la distribución de los géneros *Sphingomonas* (A), *Acinetobacter* (B), *Fusobacterium* (C) para las 22 muestras, sobre el parámetro "metástasis". 0: negativo, 1: positivo.

En la **Figura 40 A** y **B**, vemos a los géneros *Escherichia Shigella* y *Haemophilus.*

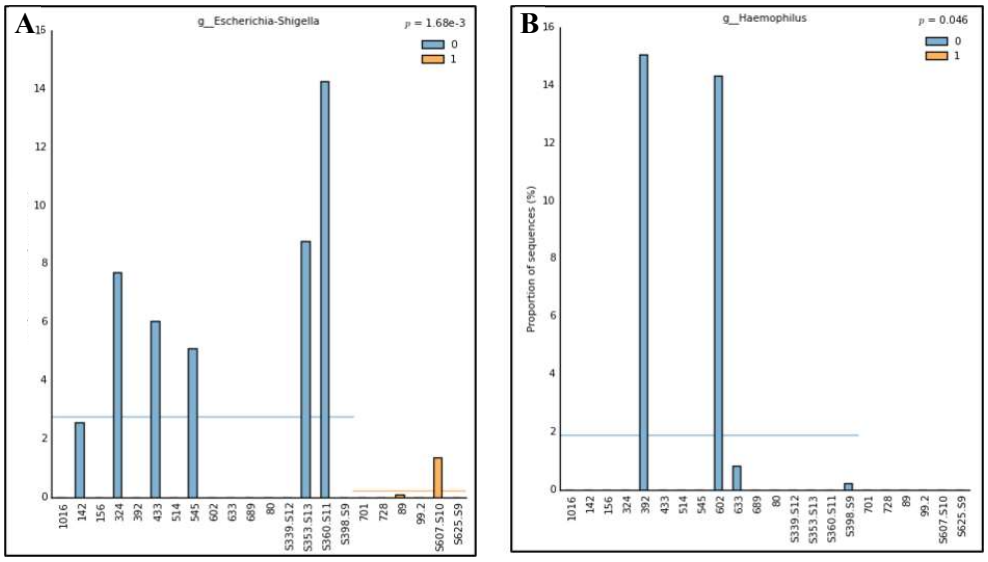


Figura 40: *Bar plot* que muestra la distribución de los géneros *Scherichia Gisella* (A), *Haemophilus* (B) para las 22 muestras, sobre el parámetro "metástasis". 0: negativo, 1: positivo.

Por último, estudiamos con mayor detalle también, el comportamiento de los datos para el parámetro de evolución tumoral: "muerte". En ese contexto pudimos observar algunos filos con relevancia estadística **Figura 41**.

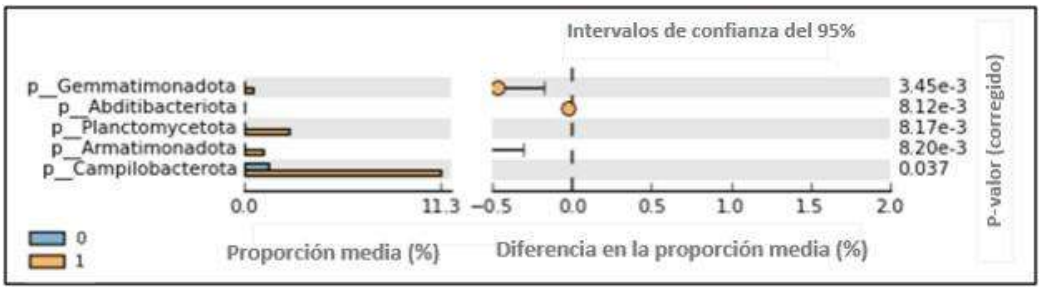


Figura 41: Diagrama de barra de error extendido que muestra la diferencia en la abundancia relativa de los grupos taxonómicos que presentaron diferencias significativas entre los pacientes de cáncer de mama con y sin muerte a nivel de filo. 0: negativo, 1: positivo.

Si vamos al detalle para la distribución de estos filos entre el grupo con y sin muerte (**Figura 42**), vemos que el grupo negativo, tiene bien representado en sus muestras a los filos *Actinobacteriota, Bacteroidota* y *Firmicutes*. No así, *Campilobaterota* que se encuentra representado en una sola muestra del grupo positivo para aquellas pacientes que fallecieron.

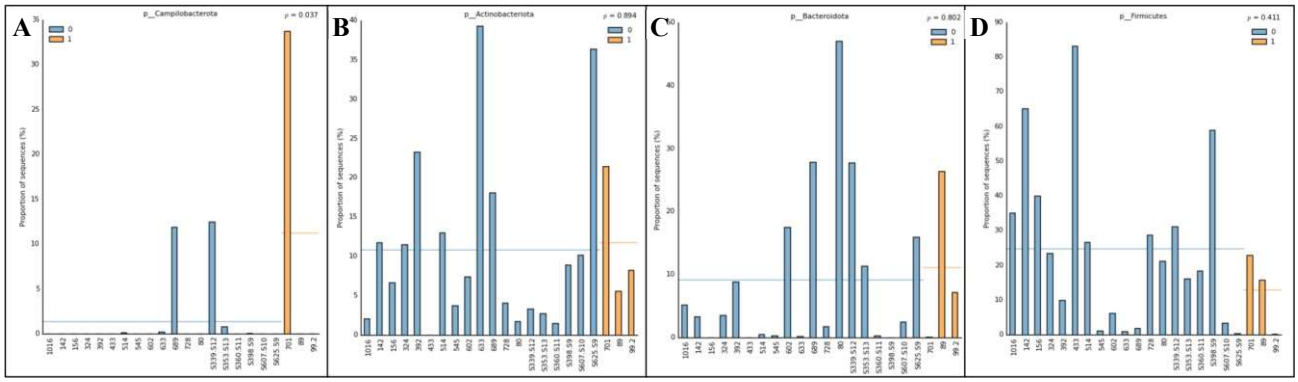


Figura 42: *Bar plot* que muestra la distribución de los filos *Campilbacterota* (A), *Actinobacteriota* (B), *Bacteroidota* (C), *Firmicutes* (D) para las 22 muestras, sobre el parámetro "muerte". 0: negativo, 1: positivo.

Al analizar los géneros para este parámetro podemos ver en la **Figura 43**, que tenemos 15 taxones con diferencias significativas entre grupos con y sin muerte.

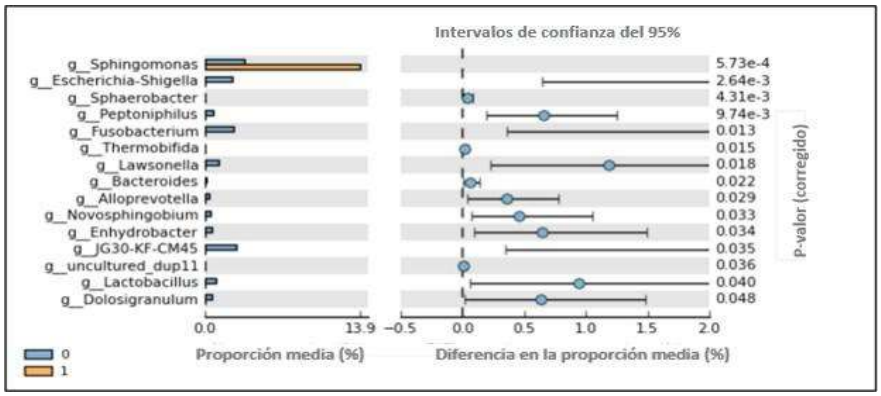


Figura 43: Diagrama de barra de error extendido que muestra la diferencia en la abundancia relativa de los grupos taxonómicos que presentaron diferencias significativas entre los pacientes de cáncer de mama con y sin muerte a nivel de filo. 0: negativo, 1: positivo.

Ya que el más representativo resultó *Sphingomonas*, decidimos ver su distribución de abundancia entre las muestras y encontramos en la **Figura 44**, que se encuentra bien representada en ambos grupos, siendo que se inclina más hacia el grupo positivo ya que el *n* es menor.

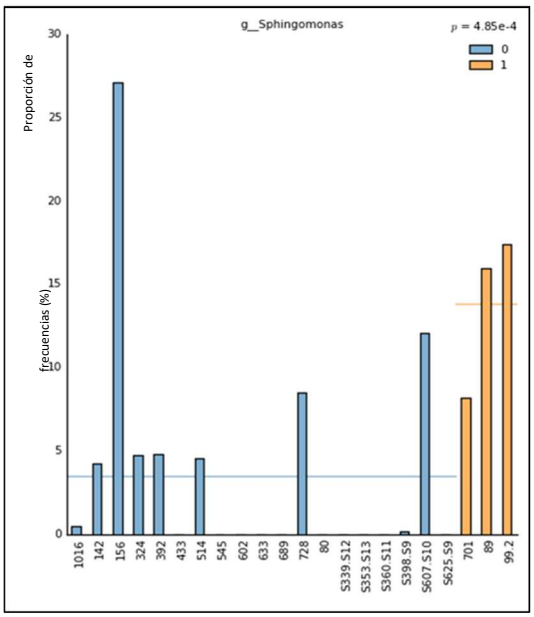


Figura 44: *Bar plot* que muestra la distribución de los filos *Sphingomonas* para las 22 muestras, sobre el parámetro "muerte". 0: negativo, 1: positivo.

5.4.3. Análisis de la diversidad Beta.

Esta medida en el contexto del estudio del microbioma se refiere a la variación en la composición de la comunidad microbiana entre individuos o grupos de individuos. Gracias a esto podemos ver variaciones entre las muestras y correlacionarlo con factores biológicos o ambientales obtenidos de la meta data.

Para este análisis utilizamos el gráfico PCoA (Análisis de Coordenadas Principales). Esta, es una herramienta gráfica que se utiliza para representar y visualizar la similitud o distancia entre muestras en un espacio multidimensional. Es decir, representa la distancia o similitud entre muestras en un espacio en el que cada dimensión representa una variable o característica. El análisis de coordenadas principales (PCoA) es una técnica estadística utilizada para reducir la dimensionalidad de los datos multivariantes, permitiendo que los patrones de similitud o diferencia entre muestras sean más fáciles de visualizar y comprender. El resultado de un análisis de PCoA se presenta como un gráfico en el que cada punto representa una muestra y su ubicación en el espacio se determina por la similitud o diferencia entre las muestras.

Para este análisis ilustramos la diversidad beta empleando el gráfico mencionado y exploramos las diferencias entre las muestras con la métrica *Unifrac.* La idea principal detrás de *UniFrac* es que la similitud entre comunidades microbianas puede medirse a través de la fracción de la diversidad filogenética que comparten. En otras palabras, se trata de medir cuánto de la diversidad filogenética presente en dos comunidades es compartida o exclusiva de cada una de ellas.

A continuación, exponemos los resultados de los gráficos desde la **figura 45a** hasta la **45h**.

En los resultados obtenidos no pudimos observar patrones claros de separación para la totalidad muestral, para ninguno de los parámetros estudiados. De todas formas, aumentando el tamaño muestral esto puede variar de manera que podrían encontrarse significancias en un futuro.

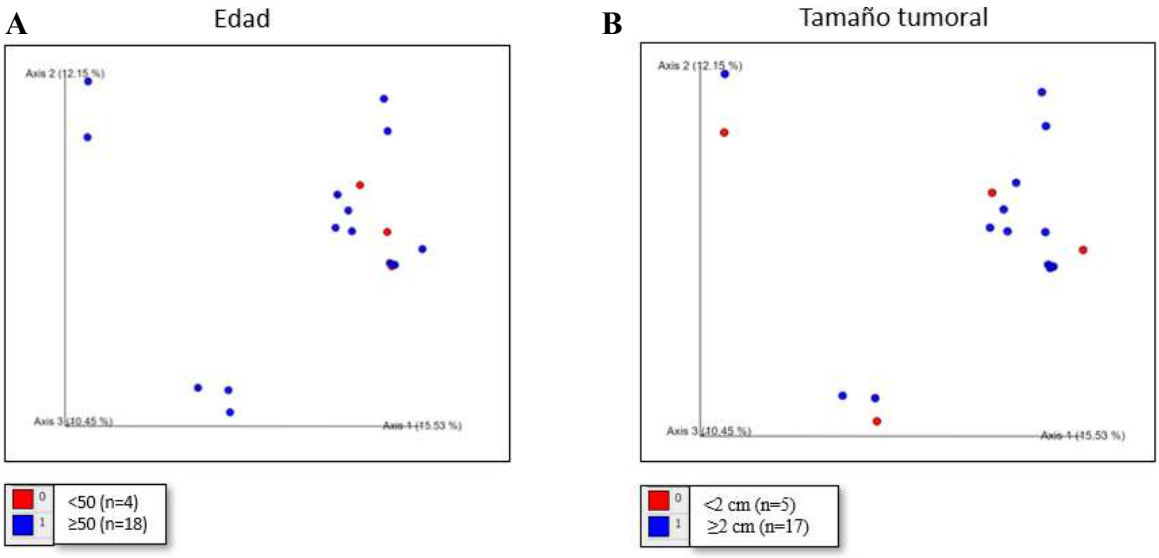


Figura 45a: Gráfico PCoA de la Diversidad Beta para los parámetros "Edad" y "Tamaño tumoral", para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado, representando el score asignado en diferentes colores. A: Edad, B: Tamaño tumoral.

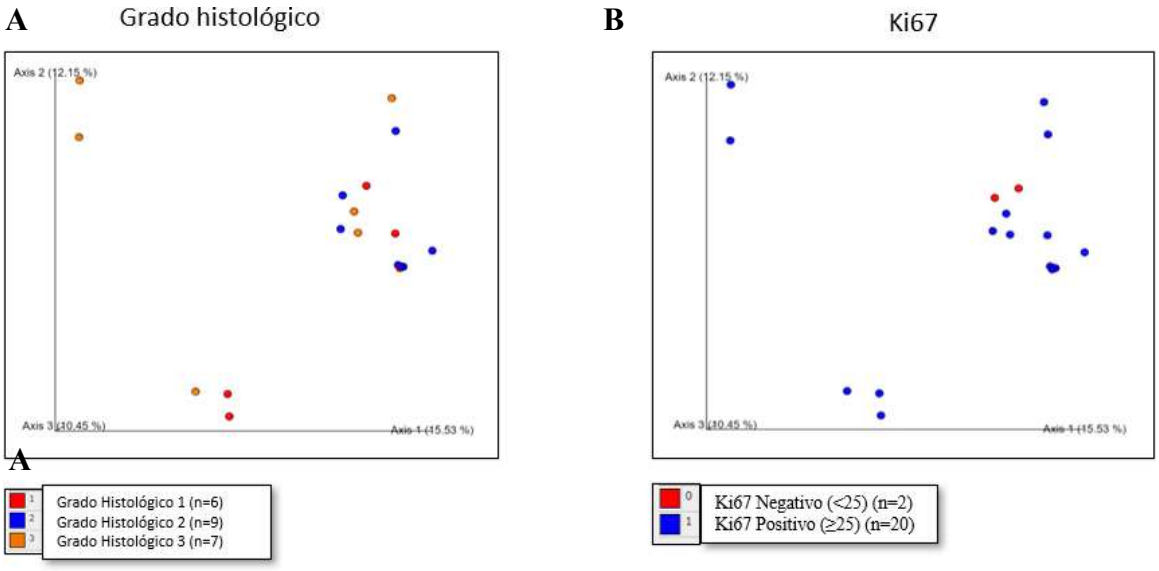


Figura 45b: Gráfico PCoA de la Diversidad Beta para los parámetros A: Grado histológico y B: Ki67, para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado, representando el score asignado en diferentes colores.

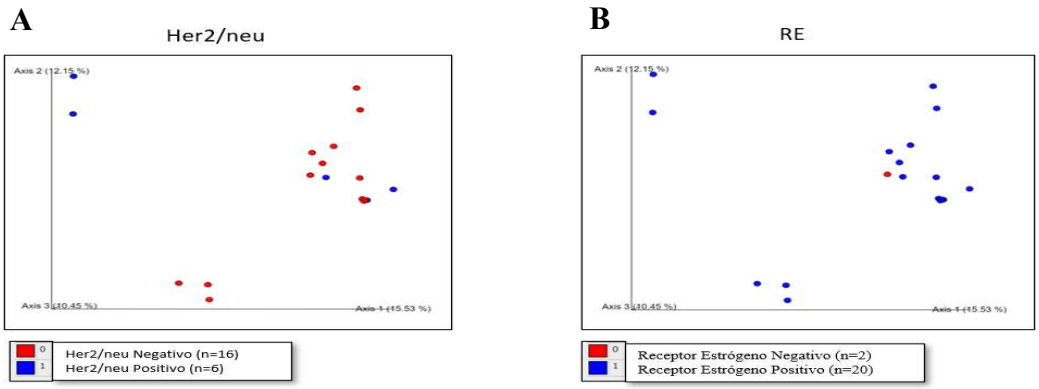


Figura 45c: Gráfico PCoA de la Diversidad Beta para los parámetros A: Her2 y B: Receptor estrógeno, para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado, representando el score asignado en diferentes colores.

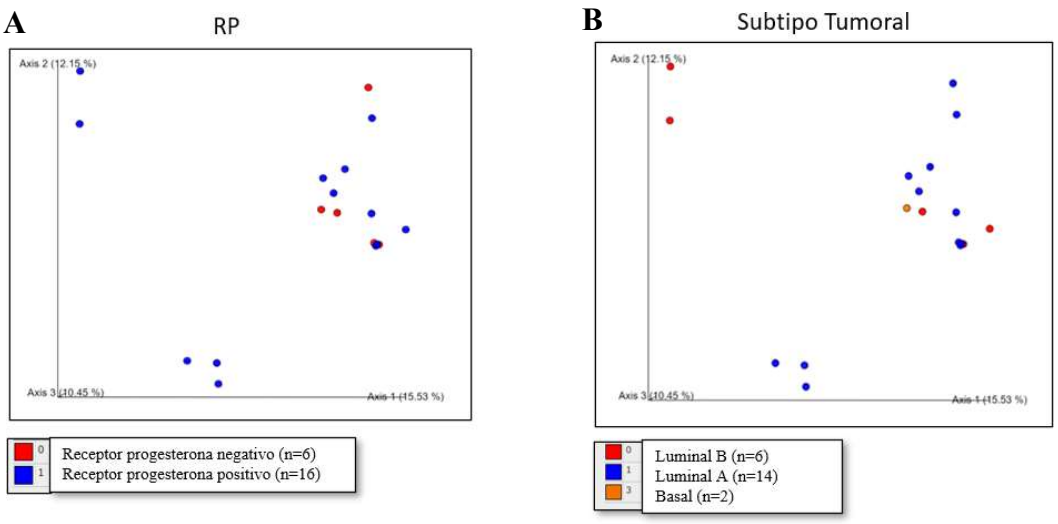


Figura 45d: Gráfico PCoA de la Diversidad Beta para los parámetros A: Receptor progesterona y B: Subtipo tumoral, para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado, representando el score asignado en diferentes colores.

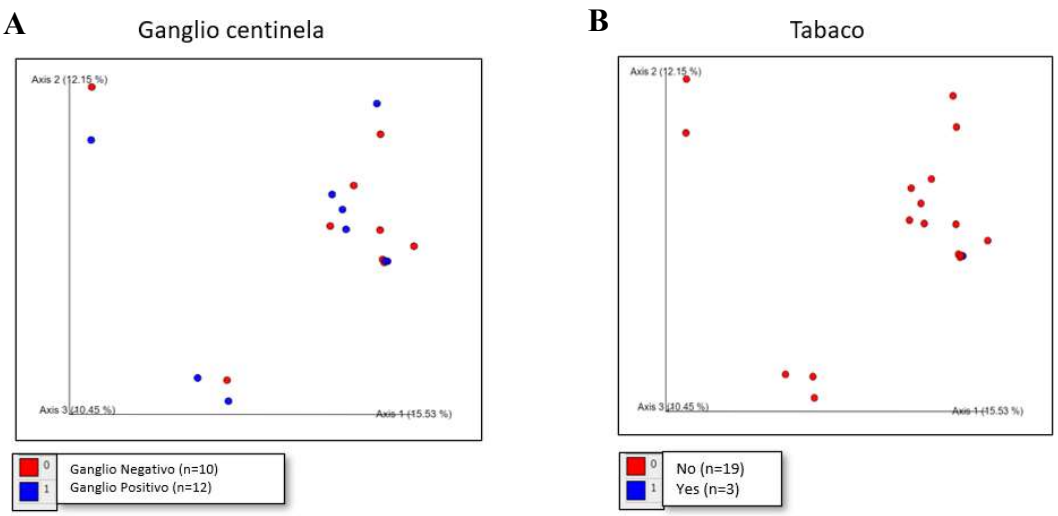


Figura 45e: Gráfico PCoA de la Diversidad Beta para los parámetros “Ganglio centinela” y “Tabaco”, para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado, representando el score asignado en diferentes colores.

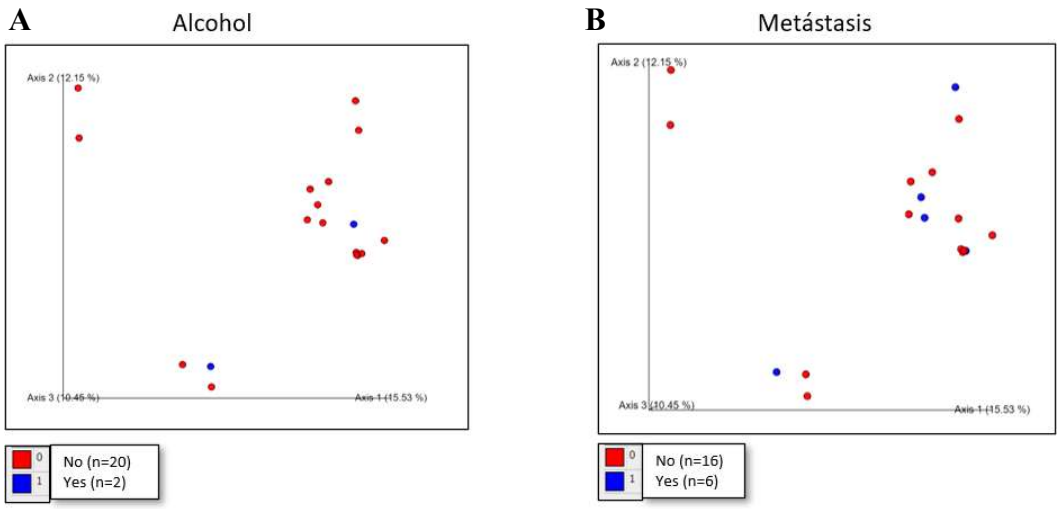


Figura 45f: Gráfico PCoA de la Diversidad Beta para los parámetros A: Alcohol y B: Metástasis, para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado, representando el score asignado en diferentes colores.

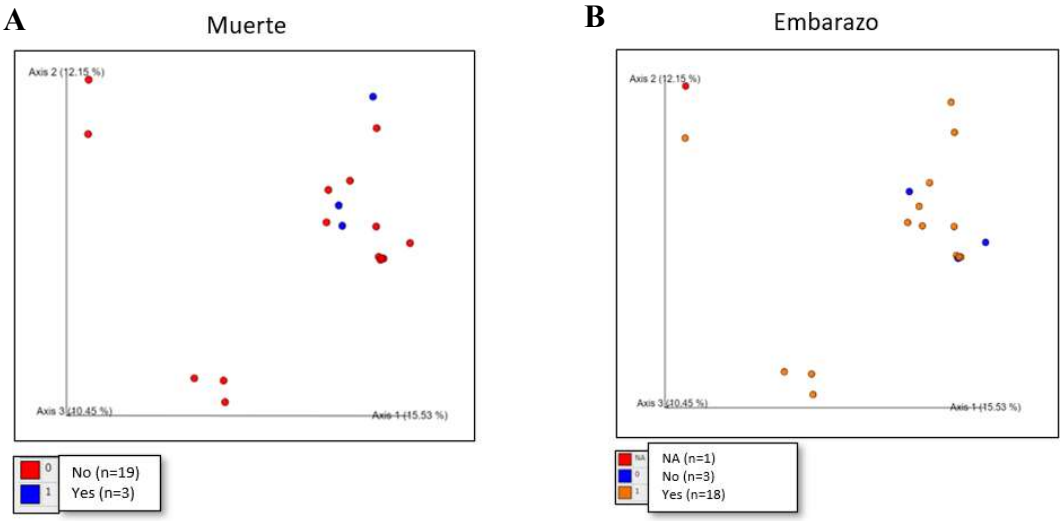


Figura 45g: Gráfico PCoA de la Diversidad Beta para los parámetros A: Muerte y B: Embarazo, para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado, representando el score asignado en diferentes colores.

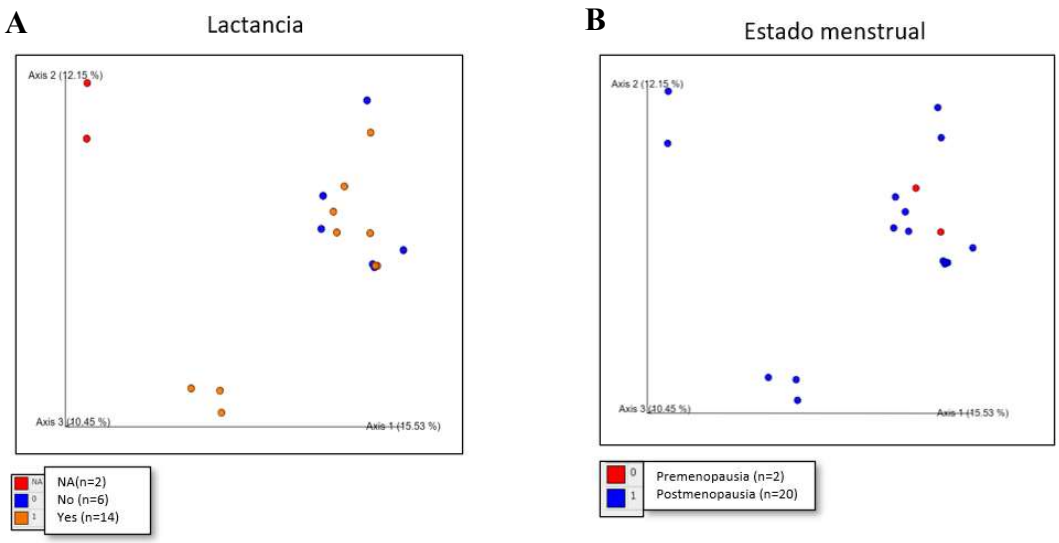


Figura 45h: Gráfico PCoA de la Diversidad Beta para los parámetros A: Lactancia y B: Estado menstrual, para las 22 muestras de tejido de cáncer de mama congelado, representando el score asignado en diferentes colores.

5.5. Análisis de las vías metabólicas predictivas.

El análisis de las vías metabólicas es esencial para comprender cómo la microbiota puede afectar al cáncer de mama y/o modular su progresión. Las vías metabólicas son un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren en el cuerpo para producir energía y mantener las funciones celulares. Esto en ocasiones, puede proporcionar información sobre cómo los microorganismos influyen en el metabolismo del huésped y cómo se relaciona con el cáncer de mama.

Por ejemplo, se ha demostrado que algunas bacterias presentes en el tejido mamario de pacientes con cáncer de mama producen enzimas que promueven la producción de estrógenos, hormonas que pueden estimular el crecimiento de las células cancerosas. Además, se ha encontrado que ciertas bacterias pueden producir metabolitos que tienen propiedades proinflamatorias, lo que puede contribuir a la progresión del cáncer de mama.

El análisis de las vías metabólicas también puede ayudar a identificar posibles biomarcadores que podrían usarse en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama. Por ejemplo, se ha demostrado que ciertos metabolitos producidos por la microbiota están asociados con un mayor riesgo de cáncer de mama metastásico.

Para este análisis se utilizó la herramienta PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States). Es una herramienta bioinformática que se utiliza para predecir las funciones metabólicas de una comunidad microbiana a partir de su composición taxonómica, utilizando como referencia bases de datos de genomas de microorganismos conocidos. En síntesis, esta herramienta permite inferir las vías metabólicas presentes en una comunidad microbiana a partir de la información de los genes que se han identificado en su secuencia de ADN. Para este análisis se predijeron un total de 409 vías metabólicas.

En total se predijo una gran cantidad de genes utilizando este programa, los cuales fueron categorizados según su función. Para este estudio utilizamos el nivel 3 de categorización de ortología KEGG. Para cada parámetro estudiado, se analizaron las funciones metabólicas de las comunidades microbianas mediante gráficos de barra de error extendido, con el fin de comparar las proporciones promedio de las secuencias asignadas

a cada función. La comparación del perfil de las funciones metabólicas predichas por PICRUSt se realizó con el software STAMP.

Las funciones metabólicas que presentaremos a continuación son significativamente distintas ($p < 0,05$) mostrando diferencias en la proporción promedio de 2 grupos de datos con intervalos de confianza del 95%.

Al analizar la proporción promedio (*mean proportion*), observamos el porcentaje de abundancia de cada vía metabólica para cada uno de los parámetros estudiados, mientras que la diferencia en la proporción media (*difference in mean proportion*), compara la abundancia relativa dentro de cada grupo. Esto nos permite comparar los resultados obtenidos con los encontrados en estudios científicos anteriores.

Elegimos para continuar, los mismos 4 parámetros que venimos incluyendo en esta parte del trabajo: ganglio centinela, receptor progesterona, metástasis y muerte. Cabe mencionar que la descripción de las vías metabólicas se encontrará en un aparatado en el anexo y se mencionarán las que tengan relevancia para la discusión de este trabajo.

En primer lugar, analizamos el parámetro de "ganglio centinela" donde pudimos encontrar diferencias estadísticamente significativas en las vías metabólicas donde se involucran los genes estudiados, entre el grupo ganglio positivo y ganglio negativo. Esto lo podemos observar en la **Figura 46**. En este caso pudimos identificar 11 vías metabólicas relacionadas con un valor de p significativo, para la variable "ganglio centinela".

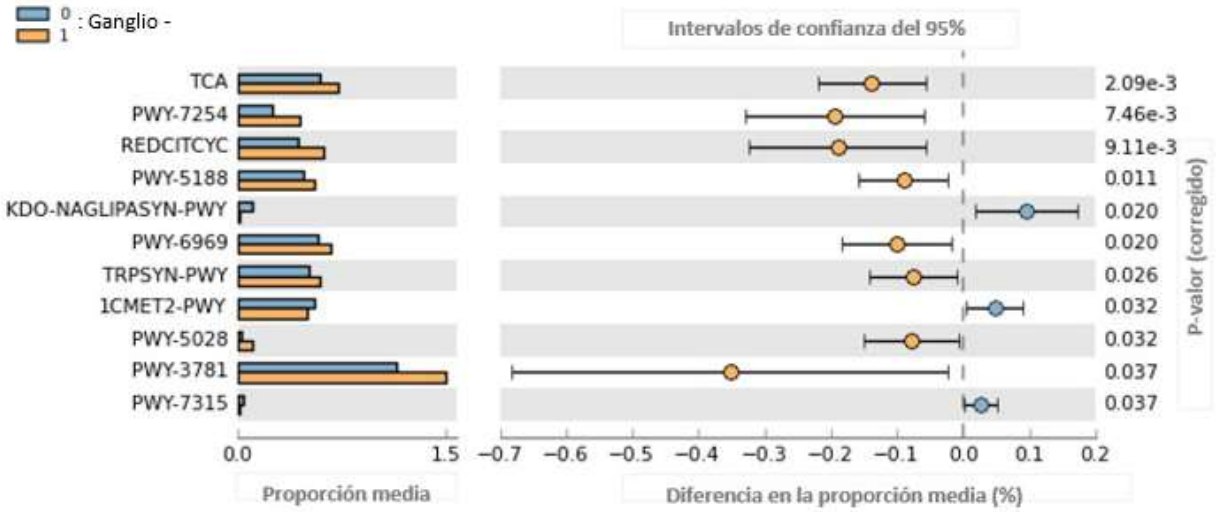


Figura 46: Diagrama de barra de error extendido de las categorías funcionales significativamente diferentes encontradas en las pacientes con ganglio centinela positivo y ganglio centinela negativo. Los números ubicados a la derecha muestran los p-valores que se derivaron de una prueba t de Welch's invertido de dos colas.

En el análisis del parámetro "receptor progesterona" (**Figura 47**) pudimos identificar 41 vías metabólicas estadísticamente significativas comparando el grupo RP+ y RP-. Esto indica que hay genes de las bacterias encontradas que, no solo se involucran en procesos metabólicos que pueden estar relacionados a la progresión favorable o desfavorable del cáncer, si no que demuestra que, analizando por grupo, podemos encontrar diferencias significativas que nos den indicios de cómo seguir el estudio del tema en un futuro considerando un tamaño muestral más amplio.

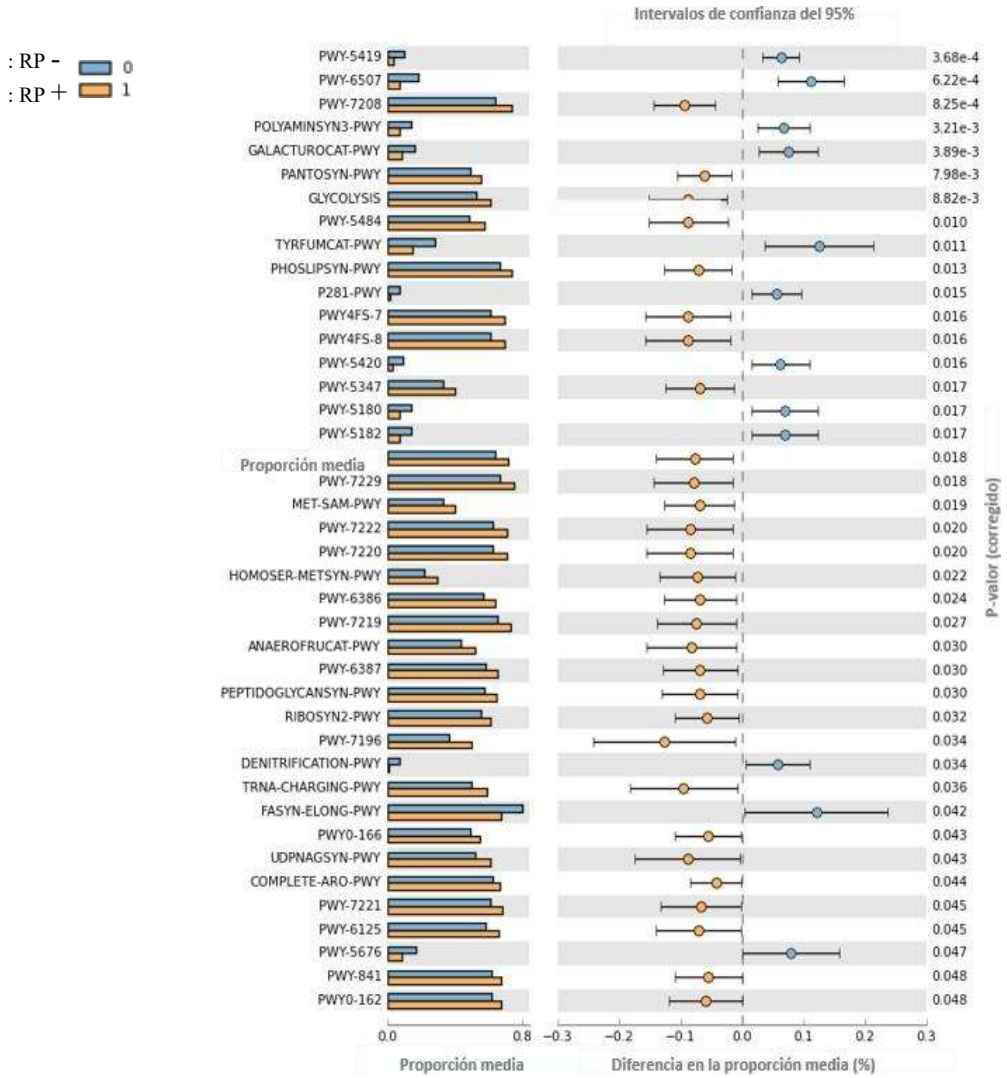


Figura 47: Diagrama de barra de error extendido que evidencia las categorías funcionales significativamente diferentes encontradas en las pacientes con receptor progesterona positivo y negativo. Los números ubicados a la derecha muestran los p-valores que se derivaron de una prueba t de Welch's invertido de dos colas.

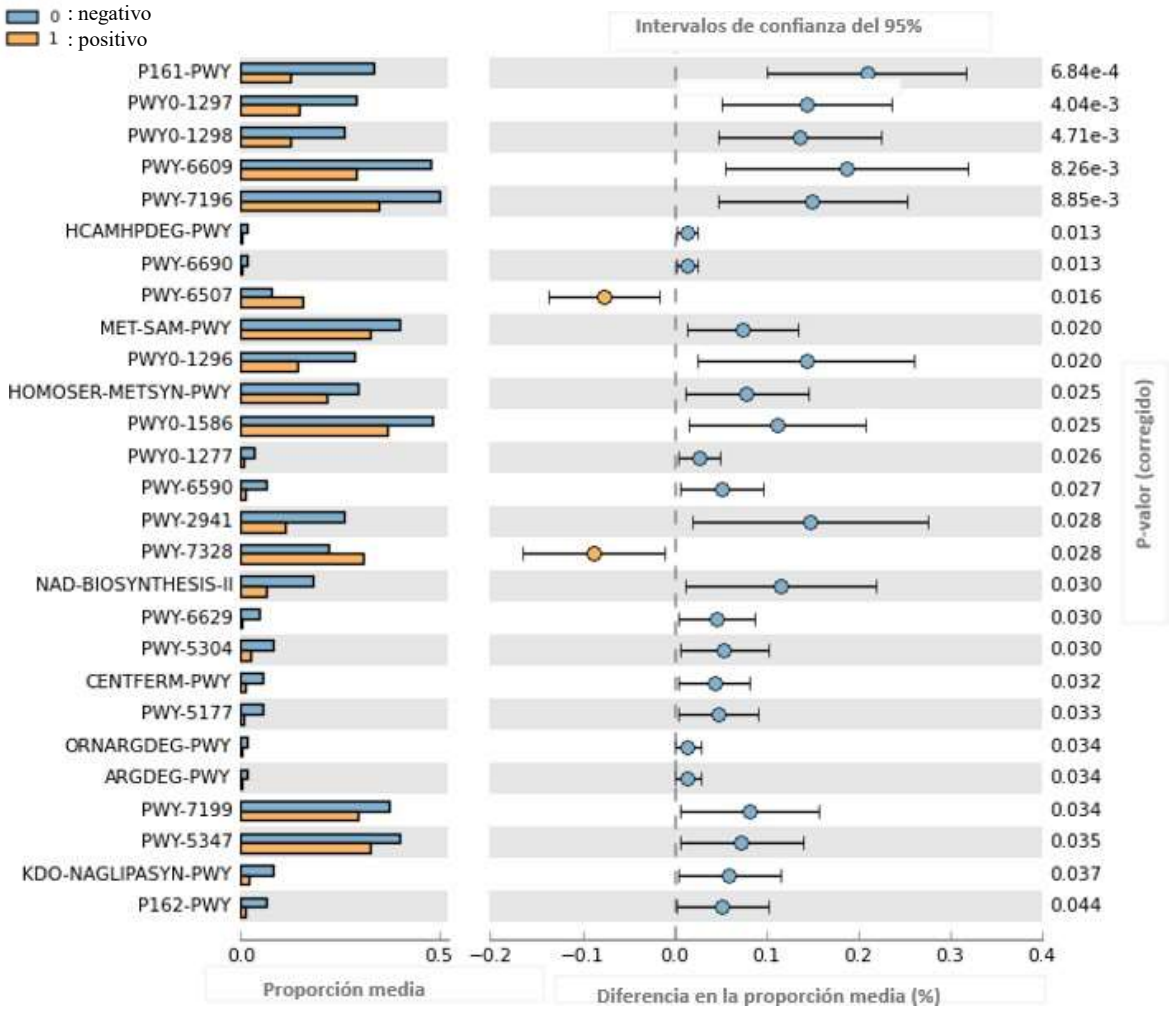


Figura 48: Diagrama de barra de error extendido de las categorías funcionales significativamente diferentes encontradas en las pacientes con metástasis positivo y negativo. Los números ubicados a la derecha muestran los p-valores que se derivaron de una prueba t de Welch's invertido de dos colas.

Por último, investigamos para el parámetro "muerte" cuáles eran las vías metabólicas donde podían involucrarse los genes obtenidos y lo presentamos en la **Figura 49**, pudiendo encontrar un total de 27 vías metabólicas relacionadas.

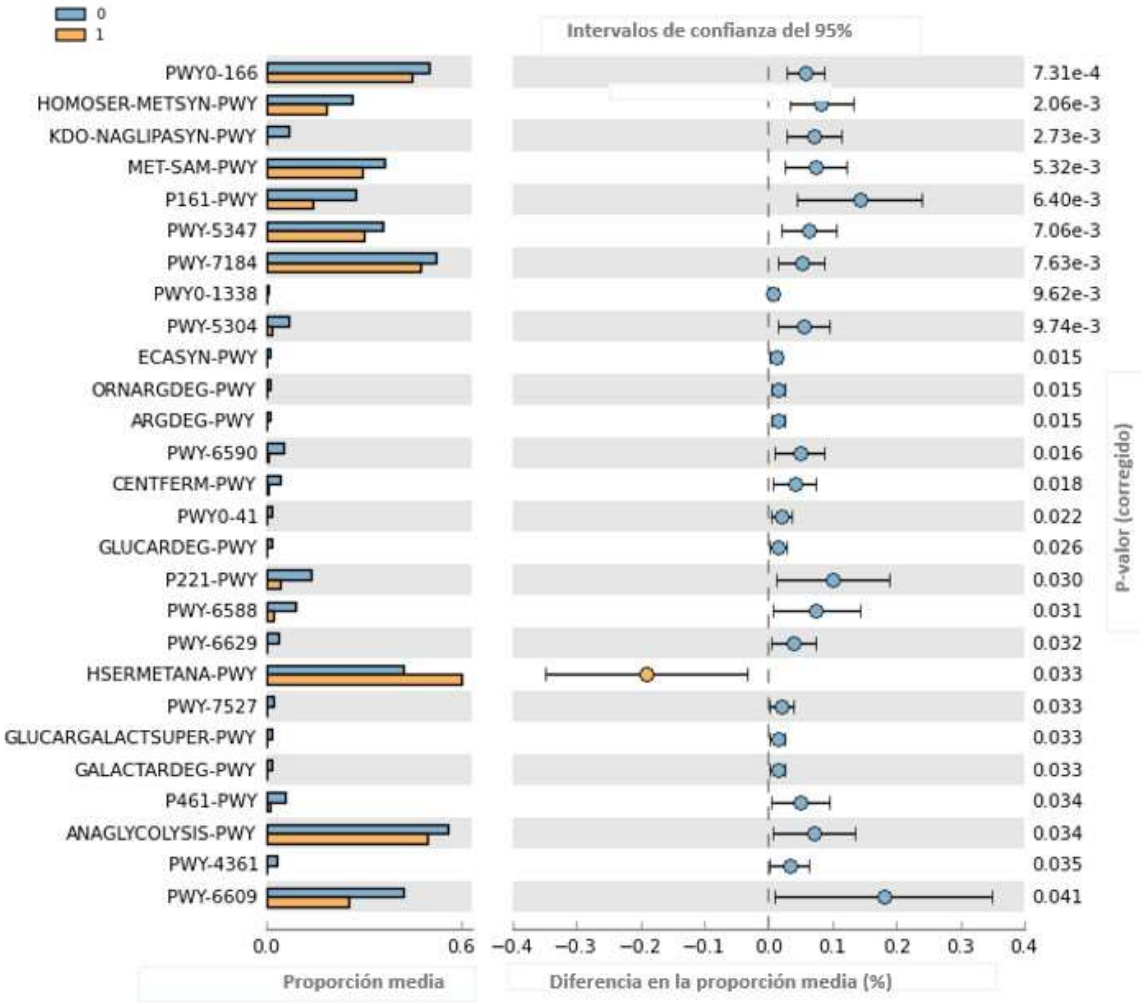


Figura 49: Diagrama de barra de error extendido de las categorías funcionales significativamente diferentes encontradas en las pacientes con metástasis positivo y negativo. Los números ubicados a la derecha muestran los p-valores que se derivaron de una prueba t de Welch's invertido de dos colas.

Utilizaremos estos resultados para establecer hipotéticas vías metabólicas que puedan relacionarse con el desarrollo del cáncer de mama.

DISCUSIÓN

El microbioma es el conjunto de microorganismos que habitan en nuestro cuerpo, especialmente en nuestro tracto gastrointestinal, pero también en otros lugares como la piel y los genitales. Estos microorganismos incluyen bacterias, hongos, virus y otros microbios que son esenciales para nuestra salud y bienestar. Es un ecosistema que juega un papel clave en la digestión, la regulación del sistema inmunológico, la producción de vitaminas y otros nutrientes, y en la protección contra enfermedades. De un tiempo a hoy, se ha descubierto que existe una relación entre la composición del microbioma mamario y el riesgo a desarrollar cáncer de mama. Algunos estudios encontraron que las mujeres con cáncer mamario tienen una composición diferente de microbioma intra tumoral en comparación con las mujeres sin cáncer de mama. Además, se demostró que ciertos tipos de bacterias presentes en el tumor pueden afectar la respuesta a la terapia y también a la progresión de la enfermedad. Estos hallazgos sugieren que el microbioma puede

desempeñar un papel importante en la prevención y tratamiento del cáncer de mama y que la comprensión de su rol podría llevar a nuevas terapias para esta enfermedad (Cho & Blaser, 2012).

La hipótesis de nuestro trabajo asume que se pueden encontrar diferencias en el microbioma del tejido tumoral mamario que favorezcan la evolución tumoral y que estos resultados puedan establecer un potencial factor pronóstico independiente del tiempo libre de metástasis y sobrevida de la paciente. Para confirmar la hipótesis, a lo largo de esta investigación, se secuenciaron muestras de tejido congelado de 22 pacientes con carcinoma ductal infiltrante para luego, analizar los datos genómicos de las bacterias encontradas en dichos tumores.

La composición del microbioma del tejido mamario en el cáncer de mama ha sido investigada en varios estudios y se han podido identificar diferentes taxones dentro de cada nivel del dominio Bacteria. A continuación, haremos un recorrido por los taxones más abundantes de cada nivel, con el objetivo de recopilar los resultados y correlacionar con otras investigaciones en el tema.

Al analizar la abundancia a nivel de filo, para las 22 muestras reportadas, pudimos encontrar 4 taxones más representativos: *Proteobacteria* y *Firmicutes,* seguido de *Actinobacteriota* y *Bacteroidetes.* Estos resultados coinciden con los reportados en estudios previos como el de Hieken *et al.* (Hieken et al., 2016) donde un grupo de investigadores analizó el microbioma en pacientes con cáncer de mama, tanto benigno como maligno, obteniendo resultados con diferencias significativas entre ambos grupos. Coincide también, con el estudio realizado en 2014 de Xuan *et al*. (Xuan et al., 2014), donde se identificaron como filos más abundantes *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria, Bacteroidetes* y *Verrucomicrobia,* este último encontrado en noveno lugar en nuestro trabajo. Esta coincidencia podría aportar evidencia adicional sobre la relación de estos filos con el cáncer de mama, pero también podría indicar un potencial papel en el desarrollo o la progresión de la enfermedad. En un estudio previamente citado, Urbaniak *et al*., donde analizaron tejido mamario de 81 mujeres con y sin cáncer en Canadá e Irlanda, también se encontraron como filos más abundante *Proteobacteria, Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, seguido por *Deinococcus-Thermus, Verrucomicrobia,* y *Fusobacteria,* este último como séptimo filo más abundante en nuestro trabajo (Urbaniak et al., 2016b).

La mayoría de los estudios generalmente indican que la microbiota del tumor de mama está dominada por estos 4 filos que encontramos, sin embargo, la misma difiere según los países, los grupos étnicos y las razas de donde provienen las muestras, sobre todo a nivel de género. Un estudio ha demostrado que la composición de la microbiota de la mama de mujeres de Canadá e Irlanda difería. En particular, las muestras de pacientes de Canadá estaban dominadas por bacterias de los géneros *Bacillus* (11,4%), *Acinetobacter* (10,0%), *Enterobacteriaceae* (8,3%), *Pseudomonas* (6,5%), *Staphylococcus* (6,5%), *Propionibacterium* (5,8%), *Comamonadaceae* (5,7%), *Prevotella* (5,0%) y *Gammaproteobacteria* (5,0%), mientras que en la población irlandesa fueron los géneros *Staphylococcus* (12,7%), *Propionibacterium* (10,1%), *Pseudomonas* (5,3%) y *Listeria welshimeri* (12,1%) (Shvets et al., 2022). En nuestro caso, los géneros más abundantes encontrados fueron *Acinetobacter* (6,25%), *Bacillus* (4,59%), *Sphingomonas* (4,58%) y *Staphylococcus* (4,44%).

Es interesante que dentro de los géneros que establecimos como más predominantes en este trabajo, encontremos *Bacillus* en segundo puesto. Se ha demostrado anteriormente (Urbaniak et al., 2014, 2016b), que dicho género podría tener efectos pro carcinogénicos.

Existe una cepa de *B. cereus,* que metaboliza progesterona para transformarla en otra molécula llamada *5-alfa-pregnane-3,20-dione* (5αP) (A Ojanotko-Harri 1, n.d.). A su vez, 5αP se ha encontrado en mayor abundancia en tejido de cáncer de mama en comparación con el tejido sano (J P Wiebe 1, n.d.). Lo que se cree es que esta molécula podría ser un potencial estimulador del desarrollo y la proliferación tumoral (J P Wiebe 1, n.d.; John P Wiebe, n.d.). Si bien fue uno de los géneros más abundantes en la totalidad muestral, dada su estrecha relación con la progesterona, decidimos observar la abundancia de este género entre los grupos con receptor progesterona positivo y negativo, sin embargo, no fue uno de los taxones que arrojó significancia estadística al estudiar este parámetro lo que no quita que en un futuro podamos aumentar el *n* y observar cambios en estos resultados.

Por otro lado, tenemos el género *Staphylococcus* en mayor abundancia en la totalidad muestral, así como también ha sido reportado en investigaciones previas. A este género se lo ha relacionado en ocasiones, con daño en el ADN. En el 2019 Deplanche et al, investigaron cómo las proteínas producidas por *S. aureus* pueden interactuar con el ADN de las células huésped para causar daño en el material genético. Los resultados del estudio indican que dicha bacteria es capaz de inducir daño en el ADN de las células huésped, lo que a su vez puede tener implicaciones en la capacidad de respuesta del sistema inmunológico para combatir la infección y para el desarrollo de enfermedades asociadas con la infección causada por esta bacteria. Esta actividad de daño en el ADN se relaciona con inflamación regional, en este caso intra tumoral y por consiguiente la creación de un ambiente propicio para el desarrollo y progresión del cáncer.

Comúnmente se utiliza el análisis de la diversidad alfa para el estudio de microbioma, que anteriormente describimos en la sección de metodología. Lo aplicamos para 2 poblaciones o grupos, en cada caso utilizando los parámetros clínico-patológicos clásicos y algunos parámetros adicionales de interés como por ejemplo muerte, metástasis o hábitos de consumo. Tuvimos la posibilidad de identificar 2 parámetros con significancia estadística; "ganglio centinela" y "receptor progesterona". Esto supone en un principio, que se encontró una disbiosis entre ambos grupos estudiados, es decir, entre las pacientes del grupo ganglio negativo y positivo, así como también entre las pacientes de receptor progesterona negativo y positivo. La información que obtenemos es más bien un índice global que si bien indica una disbiosis, no determina detalles sobre dicha disbiosis, ni la composición taxonómica de cada grupo estudiado. Para eso realizamos un análisis un poco más exhaustivo de los taxones que se pudieran identificar como estadísticamente significativos entre ambos grupos comenzando por "ganglio centinela" y "receptor progesterona" seguido de "metástasis" y "muerte". Los últimos dos los analizamos para entender si entre esos grupos había algún taxon especifico que se encontrara en mayor abundancia en algún grupo y que pueda suponer una relación con el metabolismo que conduce a los estadios avanzados del cáncer de mama.

Lo primero que pudimos observar en este análisis fue la distribución del género *Peptoniphilus* (**Figura 30**), el cual se vio mayormente representado en las muestras con ganglio negativo. Algunos estudios sugieren que estas bacterias podrían estar involucradas en el desarrollo y la progresión de ciertos tipos de cáncer. Un estudio ya había reportado la presencia de este género en mayor abundancia en la microbiota intestinal de pacientes con cáncer de mama comparado a voluntarias sanas (Z. Ma et al., 2022), sin embargo, nosotros lo vimos más abundante en el microbioma del tumor mamario en pacientes con ganglio negativo. Con este hallazgo estaríamos aportando una nueva evidencia de, por un lado, su presencia en el microbioma intra tumoral de cáncer de mama, pero por el otro estaríamos observando una diferencia comparando el comportamiento de la microbiota intestinal y la microbiota intra tumoral. Para un futuro

sería conveniente aumentar el *n* del trabajo y observar el comportamiento de este género en particular. Al tener en cuenta que el microbioma es muy dinámico y nosotros estamos observando un momento estático de este, se podría llegar a reforzar la idea de que los microorganismos interactúan con las células del huésped de diferentes maneras en el intestino y en el interior del tumor. Estas interacciones podrían afectar el comportamiento de los microorganismos y la respuesta del tumor al tratamiento y de esa forma estar involucrándose en la mala progresión de esta enfermedad.

Por otro lado, en un estudio realizado en 2018 sobre secuencias microbianas presentes en el *cfDNA* (ADN libre de células circulantes), se encontraron múltiples especies de *Sphingomonas* en pacientes con cáncer de mama. En nuestro trabajo encontramos la presencia de dicho género representativo en pacientes con receptor progesterona negativo (Figura 31). Esto es un hecho interesante ya que en el estudio de Huang et al., 2018 se postuló que las secuencias microbianas encontradas en el *cfDNA* plasmático podrían aportar información importante para mejorar el pronóstico y tratamiento en pacientes con cáncer de mama (Huang et al., 2018). Si bien estas investigaciones son preliminares, esto abre nuevas puertas para seguir sumando evidencia científica que contribuya a la construcción de más herramientas de detección temprana, pero se requiere incrementar el número de muestras. En este marco es importante remarcar que *Sphingomonas* también se encontró como un género más representado en las muestras de pacientes que hicieron metástasis, por lo que nos acercaríamos a una potencial vinculación entre este género y una evolución desfavorable de la enfermedad.

En el grupo de pacientes con receptor progesterona positivo, pudimos identificar en particular un género bacteriano mayormente representado en comparación con el grupo negativo, (**Figura 40.a**). Dicho género, *Escherichia shigella*, ha sido reportado en diferentes estudios de microbioma intestinal e intra tumoral, por ejemplo, se lo encontró dentro de los 10 géneros más abundantes en carcinoma oral de células escamosas y en cáncer colorrectal, (Galeano Niño et al., 2022), así como también fue reportado por otro grupo de investigadores como uno de los géneros más abundantes en pacientes con cáncer colorrectal en comparación con pacientes sanos, junto a otros como *Porphyromonas* y *Enterocococcus,* (T. Wang et al., 2012). En cuanto a la relación entre la progesterona y el cáncer de mama, se sabe que la exposición prolongada a altos niveles de progesterona aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Esto se debe a que promueve la proliferación de las células mamarias, lo que aumenta el número de células que puedan sufrir mutaciones y luego lleven al desarrollo de cáncer. Si bien esta relación puede resultar compleja y aún se está investigando para comprender mejor el mecanismo de cómo esta hormona afecta al desarrollo del cáncer, la emergente evidencia respalda diferentes roles de la progesterona y su influencia en la patogénesis de enfermedades del útero y del seno tales como endometriosis, cáncer de endometrio, miomas uterinos y por supuesto, cáncer de mama. En el tejido mamario normal y de cáncer de mama la progesterona cumple un rol proliferativo y carcinogénico (Kim et al., 2013). Casualmente, este género que encontramos en mayor abundancia dentro del grupo RP+, también fue reportado en pacientes con endometriosis (Ata et al., 2019). El endometrio normal o sano, es una mucosa que contiene grandes cantidades de células estromales con abundante expresión de RP, lo que influye en la proliferación y diferenciación de las células epiteliales, protegiéndolas de la carcinogénesis. Por el contrario, las células epiteliales mamarias son el blanco principal de la progesterona. La diferencia clave entre los tejidos de mama y de endometrio, que podría explicar los efectos de la progesterona, es la interacción paracrina entre el estroma y el epitelio que expresa RP (Kim et al., 2013). Por lo tanto, esta reflexión sería en principio una teoría que encuentra relación entre una

mayor abundancia de este género tanto en enfermedades del endometrio como en cáncer de mama, específicamente en el grupo de pacientes con RP+.

Un aspecto relevante a considerar es que, al enfocar nuestro análisis en la ocurrencia de metástasis encontramos, a diferencia de otros estudios, un género bien representado en el grupo de pacientes sin metástasis que se lo ha relacionado anteriormente con sobreabundancia en microbioma intra tumoral de pacientes con cáncer colorrectal y también con cáncer de mama (Alon-Maimon et al., 2022). El género en cuestión es *Fusobacterium* (**Figura 39**) y existe una cepa que pertenece a este género llamada *F. nucleatum* que ya ha sido vista en gran abundancia en tejido de cáncer mamario en modelos de ratón. Esta bacteria pertenece a los tejidos de la cavidad oral y si bien no se esclareció aún el mecanismo responsable de la asociación entre enfermedades periodontales y enfermedades sistémicas, se postuló que algunas bacterias orales, así como sus productos y algunos marcadores inflamatorios, pueden salir de la cavidad oral y entrar en el torrente sanguíneo promoviendo diversas enfermedades (Van der Merwe et al., 2021). Se ha demostrado que *F. nucleatum* promueve la progresión del cáncer de mama en modelos murinos y también conduce a resultados desfavorables en los diferentes tratamientos contra la enfermedad. (Parhi et al., 2020). Se cree que esta bacteria estimula la vía TLR4 (*Toll- like receptor 4)* (*MyD88)* en células cancerosas. Los TLR son receptores de reconocimiento de patrones que reconocen patógenos y promueven la activación de cascadas de señalización intracelular que regulan la producción de citoquinas inflamatorias asociadas con la activación del sistema inmune innato. Se ha demostrado que TLR4 está altamente expresado en diversas células cancerosas, incluyendo el cáncer de mama, y está involucrado también, en la invasión, migración, metástasis y progresión del cáncer. La activación de TLR4 resulta en la activación de varias vías involucradas en la supervivencia y la inhibición de la apoptosis, explicando su participación en la progresión del cáncer (Van der Merwe et al., 2021). Hasta el momento pudimos ver a este género bien representado en la totalidad muestral, ocupando el lugar 16° de los géneros con mayor abundancia, pero también lo encontramos significativamente más abundante en pacientes que no hicieron metástasis. *F. nucleatum* se identificó aproximadamente en el 20-30% de tumores de mama, sin embargo, su correlación con las características clínicas como estadio del tumor o el subgrupo de cáncer de mama requieren más investigación (Little et al., 2023). Por nuestra parte, creemos que es importante aumentar el número de muestras para seguir estudiando el comportamiento de este género, pero también hacer seguimiento detallado de las pacientes en las cuales *Fusobacterium* se encontró muy representado para poder correlacionar con la progresión de la enfermedad. Por último, se podría ver la posibilidad de aislar esta sepa y realizar modelos in vivo para estudiar sus mecanismos.

En cuanto a las pacientes que progresaron hacia la muerte, no pudimos identificar un patrón claro de distribución entre grupos para todos los géneros que resultaron estadísticamente significativos en su representación excepto *Sphingomonas*, que resultó el de mayor abundancia y se vio más representado en el grupo de pacientes que fallecieron (**Figura 43**). Este género ya fue investigado y reportado anteriormente en esta sección. Idealmente en un futuro, al aumentar el número de muestras, se podría llegar a resultados más contundentes.

Para finalizar la discusión de este trabajo, es importante hacer hincapié en algunas de las vías metabólicas que, siendo estadísticamente significativas entre los grupos de cada uno de los parámetros, tienen alguna relevancia en el desarrollo o en la evolución tumoral del cáncer de mama. En primera instancia, nos encontramos con la vía metabólica de la fermentación acidogénica de *Clostridium acetobutylicum,* una bacteria anaerobia

Grampositiva que se encuentra en el suelo y en el tracto intestinal de los animales. Es conocida por su capacidad de producir grandes cantidades de ácido butírico y acetona a partir de la fermentación de carbohidratos (*Https://Metacyc.Org/*, n.d.). Uno de los ácidos que produce esta bacteria es el ácido butírico, conocido por sus múltiples beneficios en la salud humana interviniendo en la deposición de lípidos en el hígado, restaurando o manteniendo las funciones de la barrera intestinal y mejorando el estado inflamatorio de ciertas enfermedades crónicas (Endo et al., n.d.). Varios estudios demostraron una marcada reducción de las bacterias productoras de butirato en el microbioma intestinal de pacientes con cáncer de colon, pero poco se conoce sobre los beneficios anti tumorigénicos de estas bacterias. En un estudio recientemente publicado, se encontró esta vía metabólica junto a la vía de fermentación de piruvato a butirato reducida (código: CENTFERM-PWY, tabla III y IV, anexo) en muestras de heces de 144 participantes con cáncer colorrectal o adenoma de alto riesgo con más de 17 años sin recidiva (Bucher-Johannessen et al., 2023). Esto es muy interesante ya que en nuestro trabajo pudimos ver estas vías metabólicas representadas con significancia estadística en pacientes que no hicieron metástasis y también en el grupo de pacientes que no fallecieron (**Figura 1 y 2, anexo**) incluso la vía de *Clostridium* también la vimos enriquecida en el grupo de pacientes con ganglio centinela negativo. Entonces por un lado a estas vías se las vio reducidas en pacientes con la enfermedad y en nuestro trabajo las vimos significativamente enriquecidas en los grupos con mejor pronóstico de cáncer de mama. Esto podría sugerir algún efecto protector de las bacterias relacionadas con dichos metabolismos y, además, estos hallazgos preliminares podrían abrir puertas a una investigación más exhaustiva para comenzar a hacer uso de cepas específicas para el tratamiento o prevención de este tipo de enfermedades.

Otra vía metabólica que arrojó resultados significativos es la de degradación de la L-histidina. Esta es una vía metabólica que se encarga de la conversión de L-histidina en compuestos útiles para el organismo. Este es un aminoácido que se encuentra en los alimentos y que no se sintetiza en el cuerpo humano, pero es importante tanto para la síntesis de polipéptidos como para la regulación de la respuesta inmunológica. Esta vía metabólica la encontramos enriquecida para los grupos que hicieron metástasis, para el grupo de pacientes que fallecieron y también para el grupo con ganglio centinela positivo (**Figura 53 anexo**). Este hallazgo podría sugerir una relación entre la evolución desfavorable del cáncer de mama y la vía de degradación de la histidina o bien, alguna relación con el producto de esta vía que es el L-glutamato. Algunos estudios postulan que el uso de histidina como suplemento dietario tendría un efecto positivo en condiciones tales como Parkinson, Alzheimer, arteriosclerosis y cáncer (Holeček, 2020). Entendiendo que las células cancerosas tienen receptores de membrana para histidina y a su vez, el microbioma intra tumoral se encuentra enriquecido para su degradación, podría cuestionarse el hecho de que el microambiente ejerza competencia por este compuesto, generando un déficit que daría lugar a un ambiente propicio para la evolución del tumor.

Por otra parte, la S-adenosil-L-metionina (SAM) es el principal donador de grupos metilo en reacciones de transmetilación fundamentales para mantener las modificaciones epigenéticas. Durante la última década, se ha investigado extensamente la SAM por sus roles anti proliferativos, pro apoptóticos y anti metastásicos en varios tipos de cáncer humano (Mosca et al., 2020). En un estudio llevado a cabo por *Mosca el al*., en el año 2019, se pudo demostrar en dos líneas celulares, que este compuesto atenuó la progresión tumoral, disminuyó el nivel de varias ciclinas y bajó la expresión de la proteína reguladora de la progresión del ciclo celular p21. El mismo grupo de investigadores, demostró en otra ocasión, que SAM provoca un arresto del ciclo celular en la fase S, inhibe la

autofagia, aumenta las especies reactivas de oxígeno e induce la apoptosis en células cancerosas (Mosca et al., 2021). En este sentido, resulta importante mencionar que en nuestra investigación, en los grupos que no hicieron metástasis, que no fallecieron y también en el grupo con ganglio centinela negativo, pudimos encontrar esta vía metabólica significativamente representada en sus muestras (Figura 3, Anexo).

CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo tuvimos la posibilidad de explorar diversas técnicas de laboratorio que nos permitieron, principalmente, aislar el microbioma intra tumoral de pacientes con cáncer de mama, a partir de muestras de tejido congelado. Esto nos enfrentó a ciertas dificultades que pudimos resolver y gracias a ello tuve la posibilidad de manipular muestras de tejido congelado, extraer ADN genómico, realizar PCRs y correr muestras en geles de agarosa múltiples veces con el fin de obtener un producto puro y amplificado antes de mandar a secuenciar.

Cuando recibimos los resultados de secuenciación y luego de su procesamiento, pudimos analizar los datos para:

- Identificar los taxones más abundantes de cada nivel taxonómico, desde filo hasta género, pudiendo encontrar similitudes relevantes con investigaciones previas.
- Comparar la diversidad alfa entre los grupos de cada parámetro clínico patológico seleccionado para nuestro análisis, logrando encontrar 2 diferencias significativas entre los grupos de “ganglio centinela” y “receptor progesterona”.
- Comparar la diversidad beta entre los grupos de cada parámetro clínico patológico, pero esta vez sin resultados significativos.
- Analizar en profundidad los taxones con diferencia significativa entre grupos, tomando como referencia los niveles taxonómicos extremos más utilizados; filo y género. Gracias a este análisis pudimos identificar filos mayormente esperados (*Proteobacteria* y *Firmicutes,* seguido de *Actinobacteriota* y *Bacteroidetes)* y géneros interesantes que reafirman la hipótesis de otros trabajos de investigación en el tema; la composición difiere según los países, los grupos étnicos y las razas de donde provienen las muestras, sobre todo a nivel de género (Urbaniak et al., 2016b). Entre los géneros más interesantes encontramos *Peptoniphilus* en pacientes con ganglio negativo. Encontramos también el género *Sphingomonas* en pacientes con peor pronóstico (metástasis y RP-) que ya había sido asociado con cáncer de mama en el 2018. Por otro lado, el género *Scherichia Shigella,* también abundante en nuestras muestras con RP+, postulando una potencial relación entre este género y el metabolismo de la progesterona. Y, por último, el género *Fusobacterium* el cual se había asociado en diversas ocasiones con progresión desfavorable del cáncer de mama, un resultado interesante que abre puertas para seguir investigando este género en la progresión de nuestras pacientes y también aumentando el tamaño muestral para obtener resultados más precisos.
- Identificar cerca de 100 vías metabólicas significantes entre los grupos analizados. Vías como la de la síntesis de metionina, o la de degradación de histidina o bien la de fermentación a ácido butírito, relacionadas en algunos casos con cáncer de mama y en otros casos con otros tipos de tumores, pero con resultados contundentes que también dejan abierta la posibilidad de nuevas líneas de investigación para el futuro.

Si bien todos estos hallazgos son preliminares, creemos que un próximo paso podría ser el cultivo, aislamiento y posterior análisis de bacterias de los tejidos de cáncer de mama, por ejemplo, para confirmar la abundancia de cepas como *B. cereus, S. aureus o F. nucleatum.* Estudiar en mayor profundidad su actividad metabólica y su interacción con el hospedador para proponer potenciales tratamientos que logren disminuir su presencia y por consiguiente disminuir la producción de metabolitos proinflamatorias que puedan intervenir en la progresión de esta enfermedad. Incluso, un abordaje terapéutico en estos momentos podría ser desde el microbioma intestinal. Entendiendo la importancia de lo que consumimos y del estilo de vida que llevamos, quedó demostrado en múltiples ocasiones, que una microbiota intestinal sana y diversa proporciona una barrera de defensa esencial para que los microorganismos oportunistas no logren el ingreso a nuestro torrente sanguíneo y por ende evitamos infecciones, inflamación de bajo grado, disbiosis, etc. Veo necesario el estudio de abordajes desde el punto de vista nutricional, para generar un ambiente propicio no solo para prevenir el desarrollo de patologías sino también para potenciar la respuesta del organismo ante diferentes tratamientos.

Se debe tener en cuenta que esta investigación se realizó con un número limitado de muestras, lo que deja en evidencia la necesidad de continuar explorando esta línea de investigación con un n mayor. Siguiendo la línea del estudio de las vías metabólicas, creemos que hay un gran camino por recorrer ya que, por el momento, lo que se conoce es meramente la presencia de los genes bacterianos en las diferentes vías, pero no se termina de elucidar el rol que cumplen en el metabolismo, es decir, no sabemos con certeza de qué forma se involucran en esos sistemas y cómo interactúan con cada hospedador. Por tanto, el estudio del metaboloma y la actividad funcional del microbioma es lo que, desde mi punto de vista, debería primar para continuar esta investigación.

También considero relevante hacer mención de que normalmente y a lo largo de las últimas décadas, el estudio del microbioma estuvo enfocado en el hallazgo de los taxones más abundantes y sus consiguientes correlaciones, sin embargo se dejó un poco de lado el estudio de la disminución de ciertos taxones y cómo, desde un punto de vista metabólico, esto podría afectar al microambiente. Un estudio recientemente publicado sostiene que "…las poblaciones microbianas que son metabólicamente independientes y aquellas que carecen de los medios para sintetizar metabolitos esenciales coexisten en armonía en un ambiente intestinal saludable, donde su resistencia diferencial al estrés es indistinguible por su taxonomía o abundancia relativa…" (Watson et al., 2023).

Los desafíos del estudio del microbioma son innegables, su dinamismo, su multifactorialidad y su relación con cada hospedador, hace que, en ocasiones, los resultados puedan verse contradictorios o confusos. Sin embargo, este es un área nueva de investigación y todo aporte de evidencia significativa, va construyendo los cimientos de lo que personalmente llamaría; nueva rama de la ciencia y la medicina. Por tanto, es necesario sumar nuevas herramientas de análisis, nuevas tecnologías y más cantidad de datos para que los hallazgos sean cada vez más precisos.

BIBLIOGAFRÍA

- A Ojanotko-Harri 1, T. N. M. P. H. K. U. P. (n.d.). *Metabolism of progesterone and testosterone by Bacillus cereus strain Socransky 67 and Streptococcus mutans strain Ingbritt*.
- Alon-Maimon, T., Mandelboim, O., & Bachrach, G. (2022). Fusobacterium

nucleatum and cancer. In *Periodontology 2000* (Vol. 89, Issue 1, pp. 166–180). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1111/prd.12426.

- American Cancer Society. (n.d.). *www.cancer.org*..
- Ata, B., Yildiz, S., Turkgeldi, E., Brocal, V. P., Dinleyici, E. C., Moya, A., & Urman, B. (2019). The Endobiota Study: Comparison of Vaginal, Cervical and Gut Microbiota Between Women with Stage 3/4 Endometriosis and Healthy Controls. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-39700-6.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492.
- Bucher-Johannessen, C., Birkeland, E. E., Vinberg, E., Bemanian, V., Hoff, G., Berstad, P., & Rounge, T. B. (2023). Long-term follow-up of colorectal cancer screening attendees identifies differences in Phascolarctobacterium spp. using 16S rRNA and metagenome sequencing. *Frontiers in Oncology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1183039.
- Cho, I., & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: At the interface of health and disease. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 4, pp. 260–270). https://doi.org/10.1038/nrg3182.
- Cresci, G. A., & Bawden, E. (2015). Gut microbiome: What we do and don't know. In *Nutrition in Clinical Practice* (Vol. 30, Issue 6, pp. 734–746). SAGE Publications Inc. https://doi.org/10.1177/0884533615609899.
- Deplanche, M., Mouhali, N., Nguyen, M. T., Cauty, C., Ezan, F., Diot, A., Raulin, L., Dutertre, S., Langouet, S., Legembre, P., Taieb, F., Otto, M., Laurent, F., Götz, F., Le Loir, Y., & Berkova, N. (2019). Staphylococcus aureus induces DNA damage in host cell. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-44213-3.
- Díaz-Faes, J. — R. A. — T. A. (n.d.). *CÁNCER DE MAMA: ASPECTOS DE INTERÉS ACTUAL*.
- Dominguez-Bello, M. G., Godoy-Vitorino, F., Knight, R., & Blaser, M. J. (2019). Role of the microbiome in human development. *Gut*, *68*(6), 1108–1114. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317503.
- Endo et al., 2013. (n.d.). *Liver Pathophysiology, 2017*.
- Francisco Guarner, J.-R. M. (n.d.). *Gut flora in health and disease*. *fukuda2016*. (n.d.).
- Galeano Niño, J. L., Wu, H., LaCourse, K. D., Kempchinsky, A. G., Baryiames, A., Barber, B., Futran, N., Houlton, J., Sather, C., Sicinska, E., Taylor, A., Minot, S. S., Johnston, C. D., & Bullman, S. (2022). Effect of the intratumoral microbiota on spatial and cellular heterogeneity in cancer. *Nature*, *611*(7937), 810–817. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05435-0.
- Heintz-Buschart, A., & Wilmes, P. (2018). Human Gut Microbiome: Function Matters. In *Trends in Microbiology* (Vol. 26, Issue 7, pp. 563–574). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.002.
- Hieken, T. J., Chen, J., Hoskin, T. L., Walther-Antonio, M., Johnson, S., Ramaker, S., Xiao, J., Radisky, D. C., Knutson, K. L., Kalari, K. R., Yao, J. Z., Baddour, L. M.,

Chia, N., & Degnim, A. C. (2016). The microbiome of aseptically collected human breast tissue in benign and malignant disease.

- *Scientific Reports*, *6*. https://doi.org/10.1038/srep30751.
- Hills, R. D., Pontefract, B. A., Mishcon, H. R., Black, C. A., Sutton, S. C., & Theberge, C. R. (2019). Gut microbiome: Profound implications for diet and disease. *Nutrients*, *11*(7). https://doi.org/10.3390/nu11071613
- Holeček, M. (2020). Histidine in health and disease: Metabolism, physiological importance, and use as a supplement. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 3). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nu12030848.
- *https://metacyc.org/*. (n.d.). *https://seom.org/*. (n.d.). *https://www.breastcancer.org/*. (n.d.). *https://www.hsph.harvard.edu/*. (n.d.).
- Huang, Y. F., Chen, Y. J., Fan, T. C., Chang, N. C., Chen, Y. J., Midha, M. K., Chen, T. H., Yang, H. H., Wang, Y. T., Yu, A. L., & Chiu, K. P. (2018). Analysis of microbial sequences in plasma cell-free DNA for early-onset breast cancer patients and healthy females. *BMC Medical Genomics*, *11*. https://doi.org/10.1186/s12920-018-0329-y.
- J P Wiebe 1, D. M. J. H. D. S. S. A. H. J. L. S. (n.d.). *The 4-pregnene and 5alpha-pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion*.
- John P Wiebe. (n.d.). *Progesterone metabolites in breast cancer*.
- Kadosh, E., Snir-Alkalay, I., Venkatachalam, A., May, S., Lasry, A., Elyada, E., Zinger, A., Shaham, M., Vaalani, G., Mernberger, M., Stiewe, T., Pikarsky, E., Oren, M., & Ben-Neriah, Y. (2020). The gut microbiome switches mutant p53 from tumour-suppressive to oncogenic. *Nature*, *586*(7827), 133–138. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2541-0
- Kim, J. J., Kurita, T., & Bulun, S. E. (2013). Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. In *Endocrine Reviews* (Vol. 34, Issue 1, pp. 130–162). https://doi.org/10.1210/er.2012-1043.
- Little, A., Tangney, M., Tunney, M. M., & Buckley, N. E. (2023). Fusobacterium nucleatum: A novel immune modulator in breast cancer? In *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/erm.2023.9.
- Ma, C., Han, M., Heinrich, B., Fu, Q., Zhang, Q., Sandhu, M., Agdashian, D., Terabe, M., Berzofsky, J..
- A., Fako, V., Ritz, T., Longerich, T., Theriot, C. M., McCulloch, J. A., Roy, S., Yuan, W., Thovarai, V., Sen, S. K., Ruchirawat, M., … Greten, T. F. (2018). Gut microbiome–mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells. *Science*, *360*(6391). https://doi.org/10.1126/science.aan5931.
- Ma, Z., Qu, M., & Wang, X. (2022). Analysis of Gut Microbiota in Patients with Breast Cancer and Benign Breast Lesions. *Polish Journal of Microbiology*, *71*(2), 217–226. https://doi.org/10.33073/PJM-2022-019.
- Mager, D. L. (2006). Bacteria and cancer: Cause, coincidence or cure? A review. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 4). https://doi.org/10.1186/1479-5876-4-14.

- Merino Bonilla, J. A., Torres Tabanera, M., & Ros Mendoza, L. H. (2017). Breast cancer in the 21st century: From early detection to new therapies. *Radiología (English Edition)*, *59*(5), 368–379. https://doi.org/10.1016/j.rxeng.2017.08.001.
- Mosca, L., Minopoli, M., Pagano, M., Vitiello, F., Carriero, M. V., Cacciapuoti, G., & Porcelli, M. (2020). Effects of S–adenosyl–L–methionine on the invasion and migration of head and neck squamous cancer cells and analysis of the underlying mechanisms. *International Journal of Oncology*, *56*(5), 1212–1224. https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5011.
- Mosca, L., Pagano, M., Pecoraro, A., Borzacchiello, L., Mele, L., Cacciapuoti, G., Porcelli, M., Russo, G., & Russo, A. (2021). S-adenosyl-l-methionine overcomes ul3-mediated drug resistance in p53 deleted colon cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), 1–18. https://doi.org/10.3390/ijms22010103.
- Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L. T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., Meltser, A., Douglas, G. M., Kamer, I., Gopalakrishnan, V., Dadosh, T., Levin- Zaidman, S., Avnet, S., Atlan, T., Cooper, Z. A., … Straussman, R. (n.d.). The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. In *Einav Yehuda- Shnaidman* (Vol. 18). http://science.sciencemag.org/.
- Parhi, L., Alon-Maimon, T., Sol, A., Nejman, D., Shhadeh, A., Fainsod-Levi, T., Yajuk, O., Isaacson, B., Abed, J., Maalouf, N., Nissan, A., Sandbank, J., Yehuda-Shnaidman, E., Ponath, F., Vogel, J., Mandelboim, O., Granot, Z., Straussman, R., & Bachrach, G. (2020). Breast cancer colonization by Fusobacterium nucleatum accelerates tumor growth and metastatic progression. *Nature Communications*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-16967-2.
- Parida, S., & Sharma, D. (2019). The microbiome–estrogen connection and breast cancer risk. In *Cells* (Vol. 8, Issue 12). MDPI. https://doi.org/10.3390/cells8121642 Robbins. (2018). *Robbins Basic Pathology*.Rosean, C. B., Bostic, R. R., Ferey, J. C. M., Feng, T. Y., Azar, F. N., Tung, K. S., Dozmorov, M. G., Smirnova, E., Bos, P. D., & Rutkowski, M. R. (2019). Preexisting commensal dysbiosis is a host- intrinsic regulator of tissue inflammation and tumor cell dissemination in hormone receptor–positive breast cancer. *Cancer Research*, *79*(14), 3662–3675. https://doi.org/10.1158/0008- 5472.CAN-18-3464.
- Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., & Han, Y. W. (2013). Fusobacterium nucleatum Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/β-Catenin Signaling via its FadA Adhesin. *Cell Host and Microbe*, *14*(2), 195–206. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.012.
- Scarpellini, E., Campanale, M., Leone, D., Purchiaroni, F., Vitale, G., Lauritano, E. C., & Gasbarrini, A. (2010). Gut microbiota and obesity. *Internal and Emergency Medicine*, *5*(SUPPL. 1), 53–56. https://doi.org/10.1007/s11739-010-0450-1.
- Sepich-Poore, G. D., Zitvogel, L., Straussman, R., Hasty, J., Wargo, J. A., & Knight, R. (2021). The microbiome and human cancer. In *Science* (Vol. 371, Issue 6536). American Association for the Advancement of Science. https://doi.org/10.1126/science.abc4552.
- Shvets, Y. V., Lykhova, O. O., & Chekhun, V. F. (2022). HUMAN MICROBIOTA AND BREAST CANCER. In *Experimental Oncology* (Vol. 44, Issue 2, pp. 95–106). Morion LLC. https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.17855.

- Silva-García, O., Valdez-Alarcón, J. J., & Baizabal-Aguirre, V. M. (2019). Wnt/β-catenin signaling as a molecular target by pathogenic bacteria. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue SEP). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02135 Sociedad Argentina de Mastología. (n.d.). *www.samas.org.ar*.
- Tanoue, T., Morita, S., Plichta, D. R., Skelly, A. N., Suda, W., Sugiura, Y., Narushima, S., Vlamakis, H., Motoo, I., Sugita, K., Shiota, A., Takeshita, K., Yasuma-Mitobe, K., Riethmacher, D., Kaisho, T., Norman, J. M., Mucida, D., Suematsu, M., Yaguchi, T., … Honda, K. (2019). A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature*, *565*(7741), 600–605. https://doi.org/10.1038/s41586-019-0878-z.
- Urbaniak, C., Cummins, J., Brackstone, M., Macklaim, J. M., Gloor, G. B., Baban, C. K., Scott, L., O'Hanlon, D. M., Burton, J. P., Francis, K. P., Tangney, M., & Reida, G. (2014). Microbiota of human breast tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(10), 3007–3014. https://doi.org/10.1128/AEM.00242-14.
- Urbaniak, C., Gloor, G. B., Brackstone, M., Scott, L., Tangney, M., & Reida, G. (2016a). The microbiota of breast tissue and its association with breast cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(16), 5039–5048. https://doi.org/10.1128/AEM.01235-16.
- Urbaniak, C., Gloor, G. B., Brackstone, M., Scott, L., Tangney, M., & Reida, G. (2016b). The microbiota of breast tissue and its association with breast cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(16), 5039–5048. https://doi.org/10.1128/AEM.01235-16.
- Van der Merwe, M., Van Niekerk, G., Botha, A., & Engelbrecht, A. M. (2021). The onco-immunological implications of Fusobacterium nucleatum in breast cancer. In *Immunology Letters* (Vol. 232, pp. 60–66). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.02.007.
- Wang, N., Sun, T., & Xu, J. (2021a). Tumor-related Microbiome in the Breast Microenvironment and Breast Cancer. In *Journal of Cancer* (Vol. 12, Issue 16, pp. 4841–4848). Ivyspring International Publisher. https://doi.org/10.7150/JCA.58986.
- Wang, N., Sun, T., & Xu, J. (2021b). Tumor-related Microbiome in the Breast Microenvironment and Breast Cancer. In *Journal of Cancer* (Vol. 12, Issue 16, pp. 4841–4848). Ivyspring International Publisher. https://doi.org/10.7150/JCA.58986.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., Jia, W., Cai, S., & Zhao, L. (2012). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME Journal*, *6*(2), 320–329. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.109.
- Watson, A. R., Füssel, J., Veseli, I., DeLongchamp, J. Z., Silva, M., Trigodet, F., Lolans, K., Shaiber, A., Fogarty, E., Runde, J. M., Quince, C., Yu, M. K., Söylev, A., Morrison, H. G., Lee, S. T. M., Kao, D., Rubin, D. T., Jabri, B., Louie, T., & Eren, A. M. (2023). Metabolic independence drives gut microbial colonization and resilience in health and disease. *Genome Biology*, *24*(1), 78. https://doi.org/10.1186/s13059-023-02924-x.
- World Health Organization. (n.d.). *https://www.who.int/es*.
- Xuan, C., Shamonki, J. M., Chung, A., DiNome, M. L., Chung, M., Sieling, P. A., &

Lee, D. J. (2014).

- Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS ONE*, *9*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083744.

ABSTRACT

The breast microbiome is still poorly understood, and while some microbes are known to be harmful to human health, the potential benefits of this microbiome are not yet fully known. To gain insight into its possible prognostic relevance in breast cancer progression, we conducted a study analyzing frozen breast tumor tissue samples from 22 women with invasive ductal breast carcinoma in clinical-pathological stages I/II and a minimum of 5-year follow-up (*Instituto Oncológico Ángel H. Roffo*). Samples were processed, and DNA was extracted using the QIAamp-DNA-Mini kit, and bacterial profiles were identified through the 16S rRNA gene using the Illumina Miseq platform. OTU classification and alpha and beta diversity analyses were performed to investigate associations with classical breast cancer parameters and tumor progression.

Our results indicate that the most representative phyla in the analyzed samples are Proteobacteria (44.20%) and Firmicutes (23.22%), followed by *Actinobacteriota* (11.00%) and *Bacteroidota* (9.44%). Moreover, we found differences in microbial abundances between patients with positive and negative sentinel lymph nodes and between patients with positive and negative progesterone receptors. We performed a preliminary taxonomic analysis of the potential bacterial profile of breast cancer patients in the Argentinean population, identifying the most representative taxa at each level, especially at the genus level, where we observed genera such as *Fusobacterium*, which is strongly associated with unfavorable breast cancer progression. We also identified metabolic pathways between patient groups, with prognostic relevance for cancer in general and some cases specific to breast cancer, such as the methionine biosynthesis pathway, which has been shown to have anti-metastatic effects in several types of cancer and could be a promising therapeutic tool.

While our study provides new insights into the possible relationship between breast microbiome composition and breast cancer's prognostic parameters, these findings open new paths for research and the development of personalized therapies based on the microbial composition of breast tissue.

ANEXO

9.1. Tablas complementarias.

TABLA XI: Tamaño muestras para cada variable estudiada con su correspondiente score asignado

Variable	Score	n
Edad	0	4
	1	18
Tamaño tumoral	0	5
	1	17
Grado histológico	1	6
	2	9
	3	7
Ki67	0	2
	1	20
HER2/NEU	0	16
	1	6
RE	0	2
	1	20
RP	0	6
	1	16
Subtipo tumoral	0	6
	1	14
	3	3
Ganglio centinela	0	10
	1	12
Tabaco	0	19
	1	3
Alcohol	0	20
	1	2
Metástasis	0	16
	1	6
Muerte	0	19
	1	3
Embarazo	0	3
	1	18

	N/A	1
Lactancia	0	6
	1	14
	N/A	2
Estado menstrual	0	3
	1	19

TABLA XII: Vías metabólicas correspondientes a cada código obtenido para el parámetro ganglio centinela. Ref. Figura 39, apartado de resultados.

Code	Metabolic Pathway
TCA	Krebbs' Cycle
PWY-7254	TCA cycle VII (acetate-producers)
REDCITCYC	TCA cycle VI (Helicobacter)
PWY-5188	tetrapyrrole biosynthesis I
KDO-NAGLIPASYN-PWY	superpathway of (Kdo)2-lipid A biosynthesis
PWY-6969	TCA cycle V
TRPSYN-PWY	L-tryptophan biosynthesis
CMET2-PWY	unknown
PWY-5028	L-histidine degradation II
PWY-3781	aerobic respiration I (cytochrome c)
PWY-7315	dTDP-*N* -acetylthomosamine biosynthesis

TABLA XIII: Vías metabólicas correspondientes a cada código obtenido para el parámetro receptor progesterona. Ref. Figura 40, apartado de resultados.

Code	Metabolic Pathway
PWY-5419	catechol degradation to 2-hydroxypentadienoate II
PWY-6507	superpathway of pyrimidine nucleobases salvage
PWY-7208	superpathway of pyrimidine nucleobases salvage
POLYAMINSYN3-PWY	superpathway of polyamine biosynthesis II
GALACTUROCAT-PWY	D-galacturonate degradation I

PANTOSYN-PWY	superpathway of coenzyme A biosynthesis I (bacteria)
GLYCOLYSIS	Glycolisis pathways
PWY-5484	glycolysis II (from fructose 6-phosphate)
TYRFUMCAT-PWY	L-tyrosine degradation I
PHOSLIPSYN-PWY	superpathway of phospholipid biosynthesis III (*E. coli*)
P281-PWY	3-phenylpropanoate degradation
PWY4FS-7	phosphatidylglycerol biosynthesis I
PWY4FS-8	phosphatidylglycerol biosynthesis II
PWY-5420	catechol degradation II (*meta* -cleavage pathway)
PWY-5347	superpathway of L-methionine biosynthesis (transsulfuration)
PWY-5180	toluene degradation I (aerobic) (*via o* -cresol)
PWY-5182	No matches found
PWY-6126	superpathway of adenosine nucleotides de novo biosynthesis II
PWY-7229	superpathway of adenosine nucleotides *de novo* biosynthesis I
MET-SAM-PWY	superpathway of S-adenosyl-L-methionine biosynthesis
PWY-7222	guanosine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis II
PWY-7220	adenosine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis II
HOMOSER-METSYN-PWY	L-methionine biosynthesis I
PWY-6386	UDP-*N* -acetylmuramoyl-pentapeptide biosynthesis II (lysine-containing)
PWY-7219	adenosine ribonucleotides de novo biosynthesis
ANAEROFRUCAT-PWY	homolactic fermentation
PWY-6387	UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide biosynthesis I
PEPTIDOGLYCANSYN-PWY	peptidoglycan biosynthesis I (meso-diaminopimelate containing)
RIBOSYN2-PWY I	flavin biosynthesis I (bacteria and plants)
PWY-7196	superpathway of pyrimidine ribonucleosides salvage
DENITRIFICATION-PWY	nitrate reduction I (denitrification)
TRNA-CHARGING-PWY	tRNA charging
FASYN-ELONG-PWY	fatty acid elongation -- saturated
PWYO-166	No matches found
UDPNAGSYN-PWY	UDP-N-acetyl-D-glucosamine biosynthesis I
COMPLETE-ARO-PWY	superpathway of aromatic amino acid biosynthesis

PWY-7221	guanosine ribonucleotides de novo biosynthesis
PWY-6125	superpathway of guanosine nucleotides de novo biosynthesis II
PWY-5676	acetyl-CoA fermentation to butanoate
PWY-841	superpathway of purine nucleotides *de novo* biosynthesis I
PWYO-162	No matches found

TABLA XIV: Vías metabólicas correspondientes a cada código obtenido para el parámetro metástasis. Ref. Figura 41, apartado de resultados.

Code	Metabolic Pathways
P161-PWY	cetylene degradation (anaerobic)
PWYO-1297	No matches found
PWYO-1298	No matches found
PWY-6609	adenine and adenosine salvage III
PWY-7196	superpathway of pyrimidine ribonucleosides salvage
HCAMHPDEG-PWY	3-phenylpropanoate and 3-(3-hydroxyphenyl)propanoate degradation to 2-hydroxypentadienoate
PWY-6690	cinnamate and 3-hydroxycinnamate degradation to 2-hydroxypentadienoate
PWY-6507	4-deoxy-L-threo-hex-4-enopyranuronate degradation
MET-SAM-PWY	superpathway of *S* -adenosyl-L-methionine biosynthesis
PWYO-1296	No matches found
HOMOSER-METSYN-PWY	L-methionine biosynthesis I
PWYO-1586	No matches found
PWYO-1277	No matches found
PWY-6590	superpathway of Clostridium acetobutylicum acidogenic fermentation
PWY-2941	L-lysine biosynthesis II
PWY-7328	superpathway of UDP-glucose-derived O-antigen building blocks biosynthesis
NAD-BIOSYNTHESIS II	NAD-BIOSYNTHESIS II
PWY-6629	superpathway of L-tryptophan biosynthesis
PWY-5304	superpathway of sulfur oxidation (*Acidianus ambivalens*)
CENTFERM-PWY	pyruvate fermentation to butanoate
PWY-5177	glutaryl-CoA degradation
ORNARGDEG-PWY	superpathway of L-arginine and L-ornithine degradation
ARGDEG-PWY	superpathway of L-arginine, putrescine, and 4-aminobutanoate degradation
PWY-7199	pyrimidine deoxyribonucleosides salvage

PWY-5347	superpathway of L-methionine biosynthesis (transsulfuration)
KDO-NAGLIPASYN-PWY	superpathway of (Kdo)2-lipid A biosynthesis
P162-PWY	L-glutamate degradation V (via hydroxyglutarate)

TABLA XV: Vías metabólicas correspondientes a cada código obtenido para el parámetro muerte. Ref. Figura 41, apartado de resultados.

Code	Metabolic Pathways
PWYO-166	No matches found
HOMOSER-METSYN-PWY	L-methionine biosynthesis I
KDO-NAGLIPASYN-PWY	superpathway of (Kdo)2-lipid A biosynthesis
MET-SAM-PWY	superpathway of S-adenosyl-L-methionine biosynthesis
P161-PWY	acetylene degradation (anaerobic)
PWY-5347	superpathway of L-methionine biosynthesis (transsulfuration)
PWY-7184	pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis I
PWYO-1338	No matches found
ECASYN-PWY	enterobacterial common antigen biosynthesis
ORNARGDEG-PWY	superpathway of L-arginine and L-ornithine degradation
ARGDEG-PWY	superpathway of L-arginine, putrescine, and 4-aminobutanoate degradation
PWY-6590	superpathway of Clostridium acetobutylicum acidogenic fermentation
CENTFERM-PWY	pyruvate fermentation to butanoate
PWYO-41	No matches found
GLUCARDEG-PWY	D-glucarate degradation I
P221-PWY	octane oxidation
PWY-6588	pyruvate fermentation to acetone
PWY-6629	superpathway of L-tryptophan biosynthesis
HSERMETANA-PWY	L-methionine biosynthesis III
PWY-7527	L-methionine salvage cycle III
GLUCARGALACTSUPER-PWY	superpathway of D-glucarate and D-galactarate degradation
GALACTARDEG-PWY	D-galactarate degradation I
P461-PWY	hexitol fermentation to lactate, formate, ethanol and acetate

ANAGLYCOLYSIS-PWY	glycolysis III (from glucose)
PWY-4361	S-methyl-5-thio-α-D-ribose 1-phosphate degradation I
PWY-6609	adenine and adenosine salvage III

9.2. Gráficos complementarios.

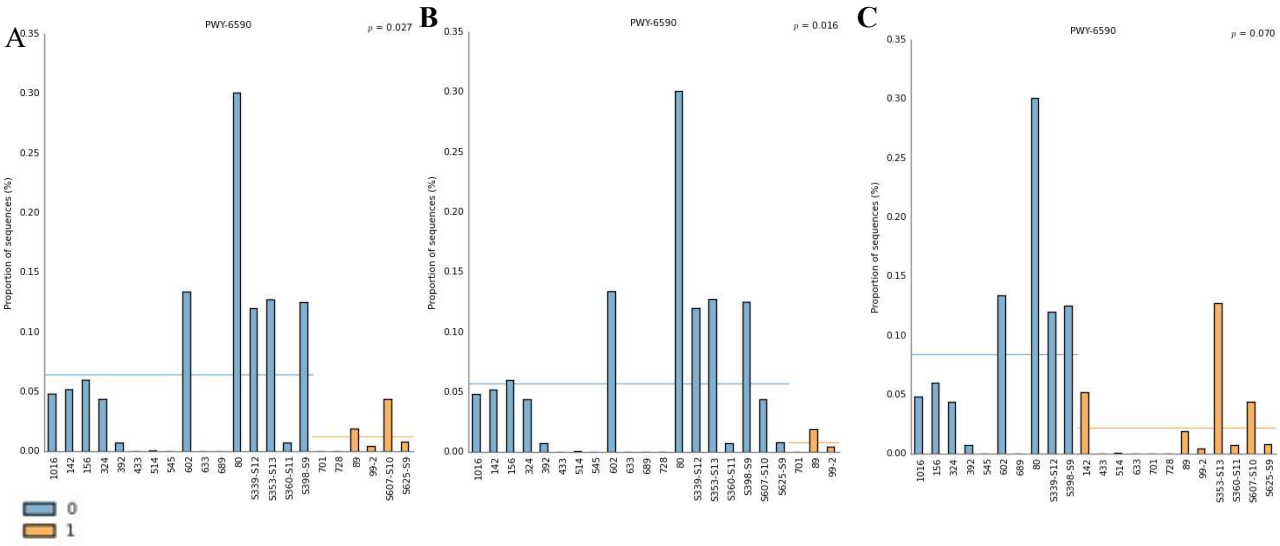


Figura 50: Bar plot de la distribución de la vía metabólica de la fermentación acidogénica de Clostridium acetobutylicum dentro de ambos grupos de cada parámetro (A), Metástasis (B), Muerte (C), Ganglio centinela, para las 22 muestras, sobre el parámetro "muerte". 0: negativo, 1: positivo.

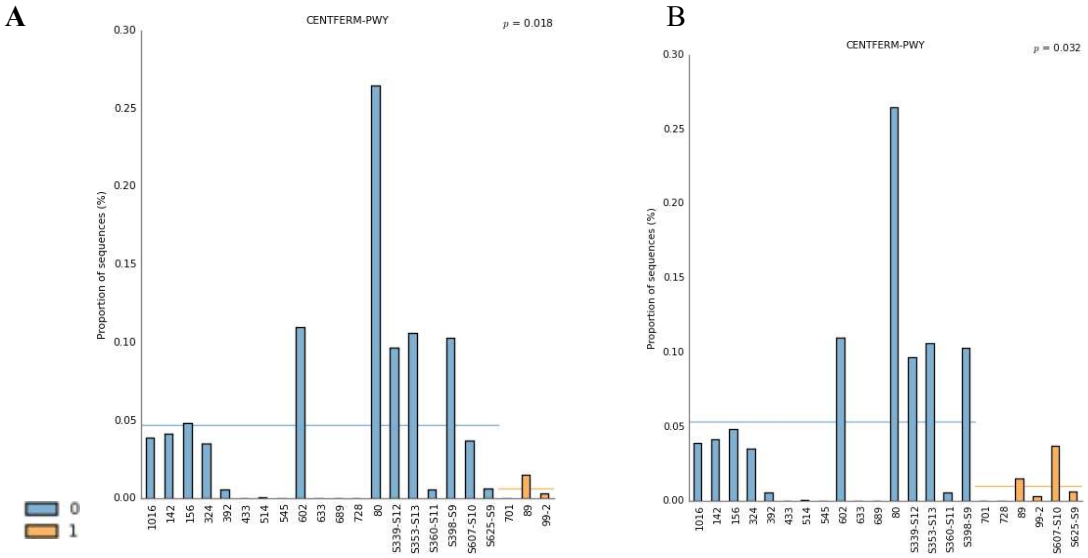


Figura 51: Bar plot de la distribución de la vía metabólica de la fermentación de piruvato a butirato dentro de ambos grupos de cada parámetro (A), Muerte (B), Metástasis, para las 22 muestras, sobre el parámetro “muerte”. 0: negativo, 1: positivo.

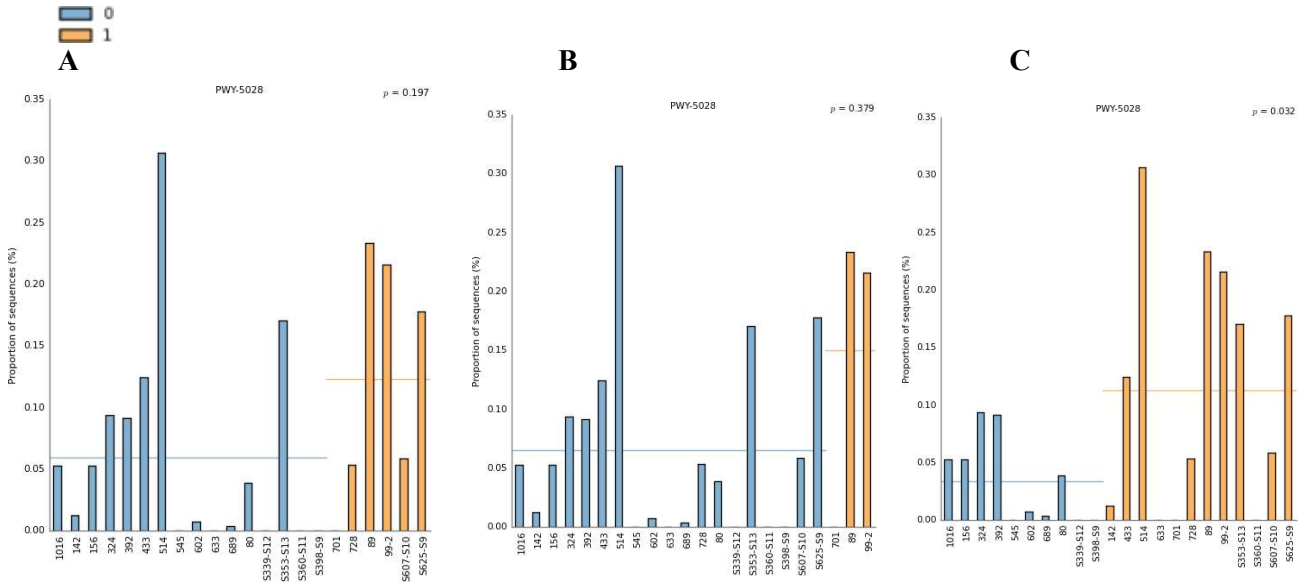


Figura 53: Bar plot de la distribución de la vía metabólica de degradación de la L-histidina dentro de ambos grupos de cada parámetro (A), Metástasis (B), Muerte (C), Ganglio centinela, para las 22 muestras, sobre el parámetro “muerte”. 0: negativo, 1: positivo.

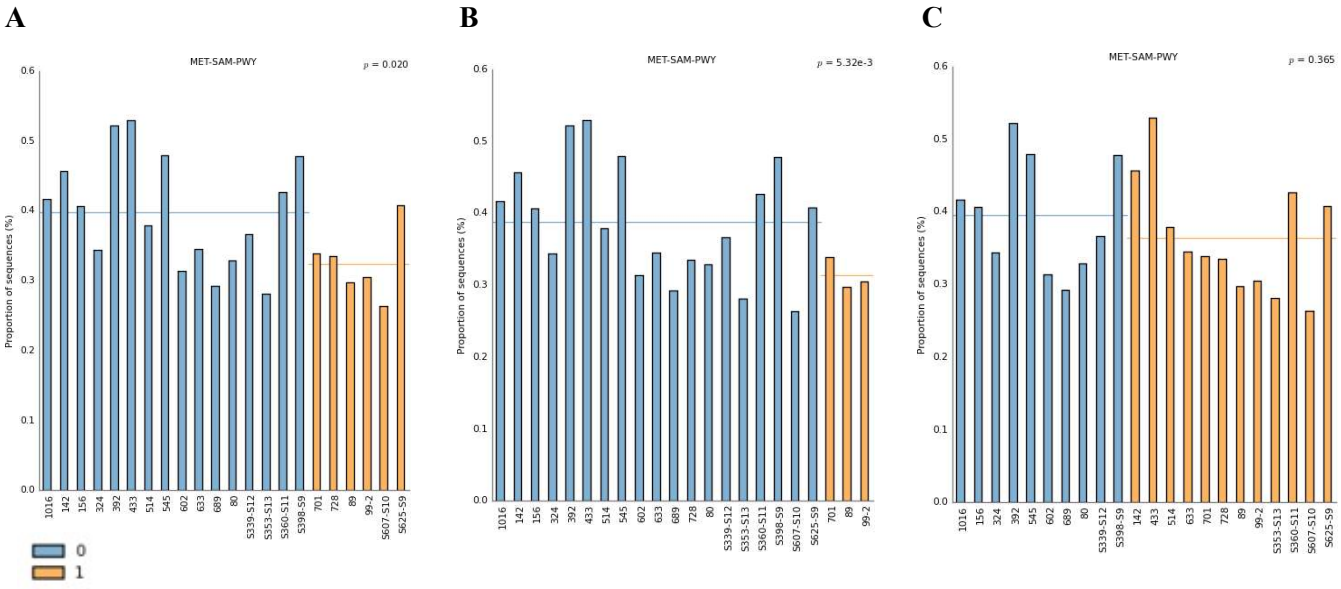


Figura 54: Bar plot de la distribución de la vía metabólica de biosíntesis de S-adenosi-L-metionina dentro de ambos grupos de cada parámetro (A), Metástasis (B), Muerte (C), Ganglio centinela, para las 22 muestras, sobre el parámetro “muerte”. 0: negativo, 1: positivo.

DINÁMICA DE LOS RESERVORIOS DE VIH LUEGO DEL TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C EN INDIVIDUOS COINFECTADOS POR VIH Y HEPATITIS C: ROL DE LOS GENES INDUCIDOS POR INTERFERÓN

Natalia Lorna Laufer

Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA. INBIRS

INTRODUCCIÓN

El tamaño del reservorio del VIH se ha asociado sistemáticamente con la expresión de marcadores de activación inmunitaria e inflamación, aunque los mecanismos de persistencia del VIH aún no se han definido claramente. En la coinfección VIH/VHC, los niveles de activación inmune observados son más altos que en la monoinfección por VIH o VHC. Existen varios mediadores solubles de activación inmunológica que pueden estar implicados en la desregulación inmunitaria en el contexto de la coinfección VIH/VHC.
Los estudios pioneros observados en algunas cohortes no mostraron ningún efecto, mientras que en otras encontraron una disminución del reservorio del VIH después del tratamiento con el VHC con IFN-α más ribavirina. Sin embargo, después de la implementación de tratamientos antivirales de acción directa (AAD), surgieron nuevas preguntas sobre la persistencia del VIH en este grupo de individuos. Por ejemplo, el tratamiento con AAD se asoció con una disminución de la activación inmunitaria intrahepática desencadenada por el IFN-α. En conjunto, esto nos permite postular una hipótesis de trabajo que enmarcará el proyecto: la eliminación de la coinfección por VHC por AAD conducirá a un aumento del reservorio del VIH debido a la reversión de la disfunción inmune causada por el VHC. Postulamos que la cura del VHC conducirá a una disminución de la actividad de las vías de señalización mediadas por interferón tipo I (α y β), lo que afectará la actividad y el tamaño del reservorio del VIH. Este trabajo tiene como objetivo evaluar el impacto de la eliminación del VHC en el tamaño del reservorio inducible del VIH, la magnitud de la respuesta de las células T específicas del VIH y la expresión de genes inducidos por interferón (ISG).

MATERIALES Y MÉTODOS

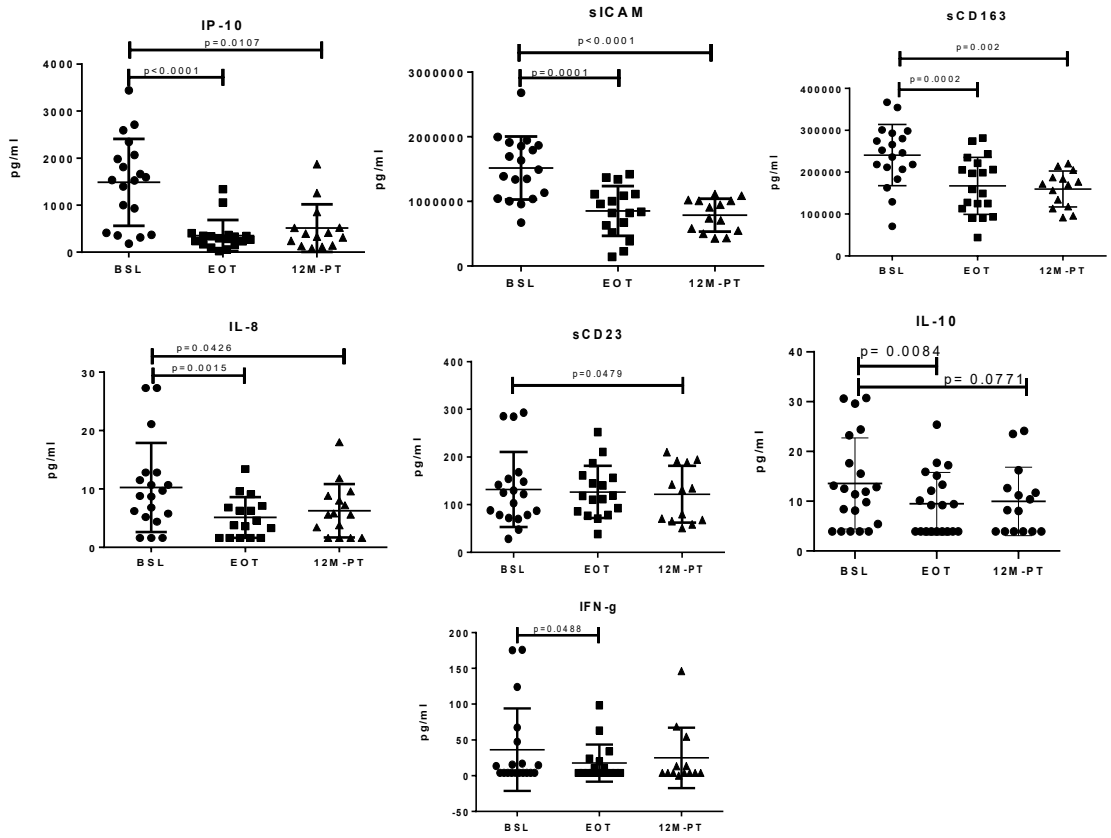
En este estudio longitudinal prospectivo participaron 22 individuos coinfectados por VIH/VHC (12 con escala de fibrosis METAVIR compatible con F4 y 10 con F0/F1). Todos los individuos recibieron tratamiento antirretroviral exitoso e iniciaron tratamiento contra el VHC con AAD (sofosbuvir+daclastavir±ribavirina). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de muestras de sangre total mediante gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque antes de AAD (BSL), al final del tratamiento (EOT) y 12 meses después del tratamiento (12MPT), y criopreservadas en nitrógeno líquido. Los genes estimulados por interferón (ISGs) OAS-1, Mx-1 e IRF-7 se analizaron mediante RT-qPCR. La respuesta específica al VIH se evaluó mediante citometría de

flujo después de la estimulación con péptidos Nef y Gag. Las células específicas se identificaron mediante tinción de citocinas intracelulares. Se utilizó el ensayo de dilución limitante inducida por Tat/Rev (TILDA) para cuantificar el reservorio inducible del VIH.

RESULTADOS

En los resultados preliminares de nuestro grupo, observamos que la eliminación del VHC tras el tratamiento con AAD se asoció con una disminución estadísticamente significativa de los marcadores solubles de inmunoactivación IP-10, ICAMs, IL-8, IL-10 (solo entre BSL y EOT), IFN-γ y CD23s (solo entre BSL y 12M-Post tratamiento) (Figura 1). La eliminación del VHC por TDA en individuos coinfectados por VIH/VHC se asociaría con una disminución de la inflamación sistémica que se mantiene hasta un año después de finalizar el tratamiento.

Figura 1. Niveles de marcadores solubles en individuos coinfectados por VIH/VHC al inicio (BSL), al final del tratamiento (EOT) y 12 meses después del tratamiento (12M-PT) con DAA. Urioste A, et a. Actual. SIDA. Infectol 2020; 28(108): 30-37.



Además, cuando se evaluaron IP-10 y sICAM en monoinfecciones por VIH y coinfección por VIH/virus de la hepatitis B (VHB), los individuos con coinfección por VIH/VHC mostraron niveles significativamente más altos en cualquier etapa del tratamiento contra el VHC.

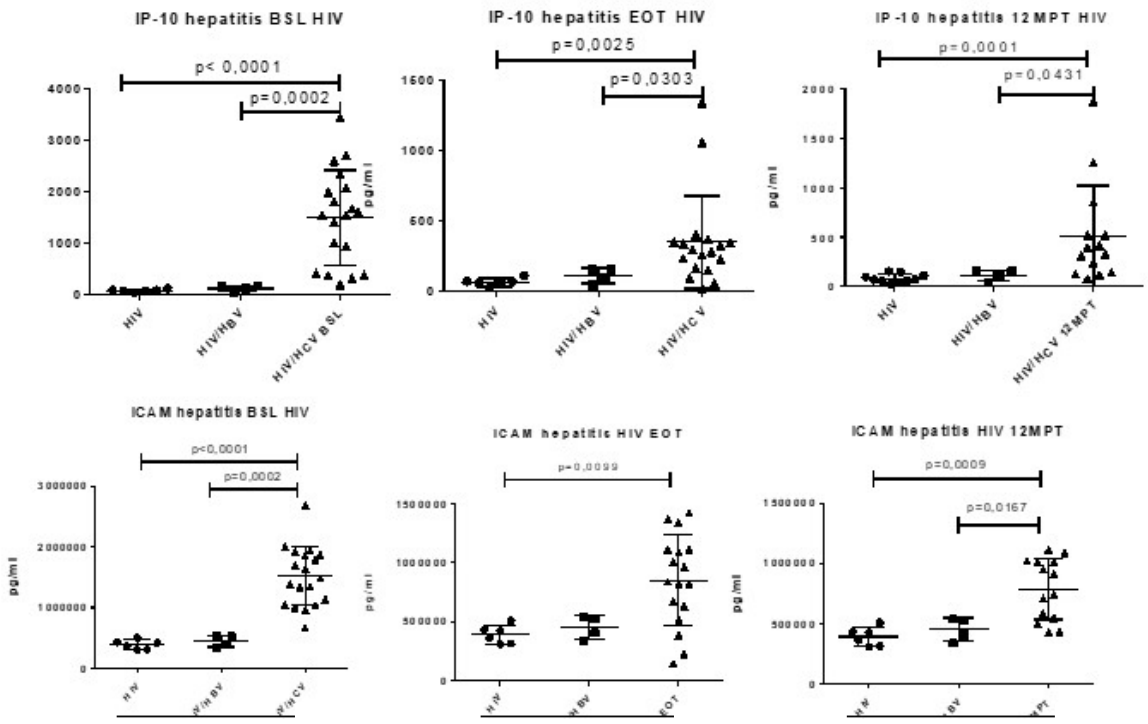


Figura 2. Niveles de IP-10 y sICAM en individuos monoinfectados por VIH, coinfectados por VIH/VHB y coinfectados por VIH/VHC. Para este último grupo, se consideraron los estadios de tratamiento de DAA (BSL: línea de base, EOT: final del tratamiento, 12M-PT: 12 meses después del tratamiento).

También evaluamos la respuesta inmune específica del VHC en individuos coinfectados por VIH/VHC en BSL, EOT y 12M-PT. Las PBMC se incubaron durante 4 días bajo la estimulación con péptidos que abarcan proteínas estructurales (núcleo, E1 y P7) y no estructurales (NS4a, NS5a y NS4b) del VHC. El interferón-γ se midió en sobrenadantes de cultivos celulares mediante ELISA después de la estimulación. Se observó un aumento en la respuesta específica al VHC entre BSL y EOT para los antígenos NS4a/NS4b y NS5a/NS4b (Figura 3). La mejoría en la respuesta celular específica al VHC después del aclaramiento viral puede deberse a la eliminación de la estimulación crónica por antígenos del VHC, lo que reduciría el agotamiento de las células y permitiría la proliferación de células específicas tras la reestimulación in vitro.

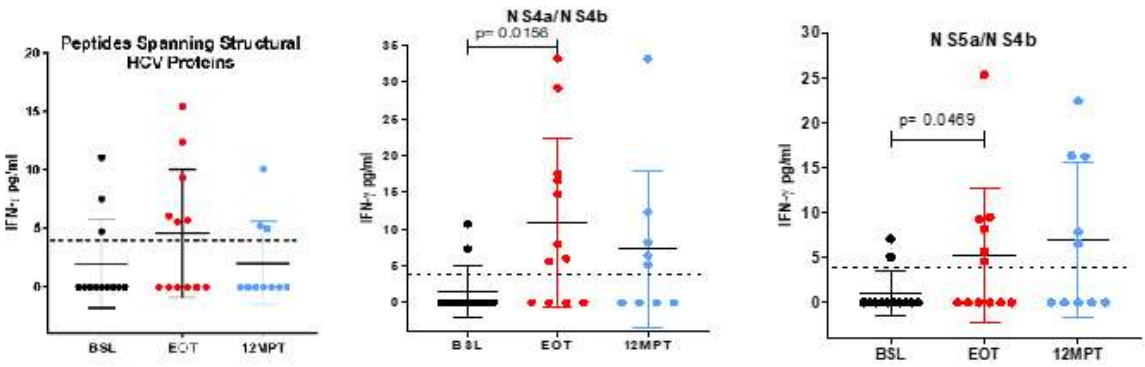


Figura 3. Niveles de interferón-γ después de la estimulación de PBMC con péptidos que abarcan proteínas del VHC estructurales y no estructurales (NS4a/b y NS5a) en diferentes etapas del tratamiento del VHC (BSL: línea de base, EOT: final del tratamiento, 12M-PT: 12 meses después del tratamiento).

De acuerdo con estos resultados, se evaluó la expresión de ISGs, la respuesta inmune específica del VIH y el reservorio del VIH en individuos coinfectados por VIH/VHC. Se encontró una disminución significativa en la expresión de OAS-1 [media±DE: 0.12±0.23 vs. 0.04±0.06(–ΔCt)2, p=0.0313] y Mx-1 [0.65±1.09 vs. 0.06±0.05(–ΔCt)2, p=0.0156] entre las muestras de BSL y 12 MPT. No se encontraron diferencias significativas entre los individuos coinfectados por VIH/VHC y los monoinfectados por VIH (Figura 4).

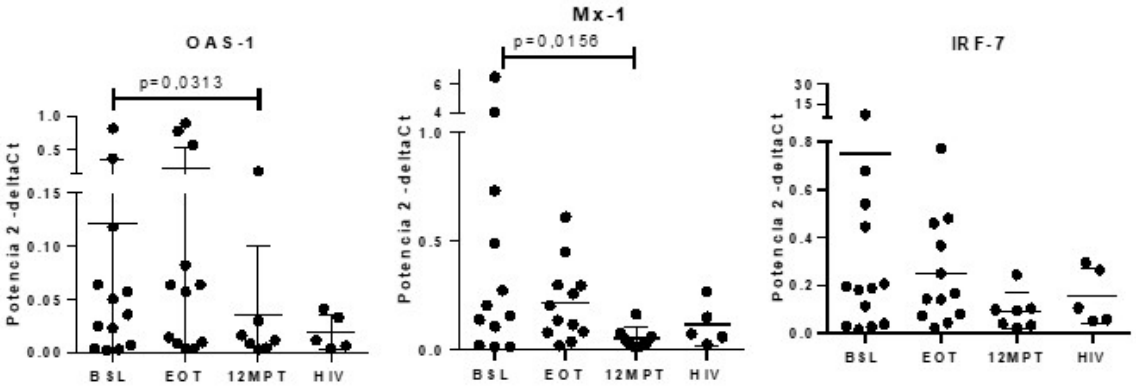


Figura 4. Expresión de genes estimulados por interferón (ISG) OAS-1, Mx-1 e IRF-7 en individuos coinfectados por VHC/VIH en BSL: línea de base, EOT: final del tratamiento, 12M-PT: 12 meses después del tratamiento e individuos monoinfectados por VIH.

Cuando evaluamos el reservorio del VIH, hubo un aumento en el total de células de ADN asociadas al VIH en los individuos coinfectados por el VIH/VHC en comparación con los individuos monoinfectados por el VIH y los individuos coinfectados por el VIH/VHB (Figura 5).

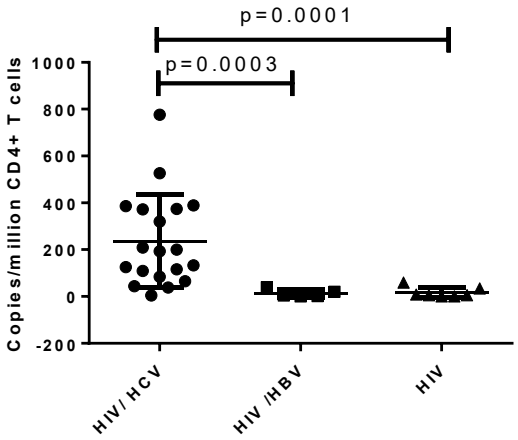


Figura 5. Niveles de ADN total asociado al VIH asociado a células de ADN (copias/millones de células T CD4+) en individuos monoinfectados y coinfectados (VHC o VHB).

Sin embargo, cuando medimos el reservorio del VIH en diferentes etapas del tratamiento del VHC con TILDA, no se encontraron diferencias significativas. Además, no se encontraron diferencias en la magnitud de la respuesta de las células T específicas del VIH.

DISCUSIÓN

Después de la eliminación del VHC, se observó una disminución significativa de la inmunoactivación, que podría estar mediada por la vía de ISG, en asociación con marcadores solubles IP-10, sCD23, sICAM, IFN-γ, sCD163, IL-8, IL-10. Esto podría deberse a la eliminación de la estimulación crónica de los antígenos del VHC. Sin embargo, no hubo evidencia de un cambio en los parámetros del reservorio inducible del VIH o en la respuesta específica contra el VIH, secundario a esta reducción de la inflamación por ISG. Un tiempo de seguimiento más largo y un mayor número de individuos podrían ayudar a evaluar mejor estos parámetros.

CONCLUSIÓN

El reservorio viral inducible del VIH no se vería afectado por la eliminación del VHC después del tratamiento con AAD en individuos coinfectados con el VIH/VHC, incluso en el contexto de la reconstitución inmunitaria.

REFERENCIAS

1. Ghiglione Y, Polo ML, Urioste A, Rhodes A, Czernikier A, Trifone C, et al . Hepatitis C Virus (HCV) Clearance After Treatment With Direct-Acting Antivirals in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-HCV Coinfection Modulates Systemic

Immune Activation and HIV Transcription on Antiretroviral Therapy. Open Forum Infect Dis. 2020 Apr 2;7(5):ofaa11.

2. Inflamación sistémica y desregulación inmune: rol en la patogénesis de la coinfección VIH/VHC. Alejandra Urioste, María Laura Polo, César Trifone, Gabriela Turk y **Natalia Laufer**. ASEI, octubre 2020, número 102. DOI: https://doi.org/10.52226/revista.v28i102.39.
3. HCV CLEARANCE BY DIRECT ANTIVIRAL AGENTS IS ASSOCIATED WITH DECREASED EXPRESSION OF INTERFERON STIMULATED GENES BUT NOT WITH THE SIZE OF THE INDUCIBLE HIV RESERVOIR. Alejandra Urioste, Alejandro Czernikier, Ana Paletta, Federico Remes Lenicov, Ariel Osegueda, María Laura Polo, Alicia Sisto, Florencia Quiroga, Gabriela Turk, Yanina Ghiglione, Natalia Laufer. Reunión Anual de Sociedades de Biociencias 2022. 16-19 de noviembre de 2022. Mar del Plata, Buenos Aires. Presencial.
4. HCV specific immune reconstitution after treatment in HIV/HCV coinfected individuals. A. Urioste, M.L. Polo, A. Osegueda, G. Turk, F. Quiroga, N. Laufer. 18th European AIDS Conference. October 27-30, 2021. Online&London, UK.
5. Long-term modification of the HIV reservoir after HCV clearance with direct-acting antivirals (DAAs): the potential role of Ribavirin G Turk, ML Polo, Y Ghiglione, A Urioste, J Salido, A Rhodes, Gabriela Poblete, Alicia Sisto, H Salomon, SR Lewin, N Laufer. 10th IAS Conference on HIV Science (IAS 2019), Mexico City, Mexico. 21-24 July 2019.

ABSTRACT

The size of the HIV reservoir has been consistently associated with the expression of markers of immune activation and inflammation, although the mechanisms of HIV persistence have not been already clearly defined. In HIV/HCV co-infection, the levels of immune activation observed are higher than in HIV or HCV monoinfection. There are several soluble mediators of immunological activation that may be involved in the immune dysregulation in the context of HIV/HCV coinfection.

We postulate that HCV cure will lead to decreased activity of type I interferon-mediated signaling pathways (α and β) which will affect the activity and size from the HIV reservoir. This work aims to evaluate the impact of HCV clearance on the size of the inducible HIV reservoir, the magnitude of the HIV-specific T-cell response and the expression of interferon induced genes (ISGs).

After elimination of HCV, a significant decrease in immunoactivation was observed, that could be mediated by ISGs pathway, in association with IP-10, sCD23, sICAM, IFN-γ, sCD163, IL-8, IL-10 soluble markers. This could be due to the elimination of chronic stimulation of HCV antigens. However, there was no evidence of a change in the parameters of the inducible HIV reservoir or in the specific anti-HIV response, secondary to this reduction in inflammation by ISGs. A longer follow-up time and a larger number of individuals could help to further evaluate these parameters.

In conclusion, the inducible viral HIV reservoir would not be affected by HCV clearance after DAA treatment in individuals coinfected with HIV/HCV, even in the context of immune reconstitution.

ABORDAJE MOLECULAR DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES: DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y ASESORAMIENTO GENÉTICO

Leonela N. Luce, Chiara Mazzanti, Micaela Carcione, Florencia Giliberto

Laboratorio de Distrofinopatías, Cátedra de Genética, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo INIGEM - UBA - CONICET

INTRODUCCIÓN

Las Distrofias Musculares (DM) son patologías hereditarias que ocasionan debilidad y degeneración progresiva del músculo esquelético. Si bien bajo este término se incluye un gran grupo de desórdenes, los rasgos clínicos que presentan se solapan, dificultando la tarea de diferenciar entre ellas. Las DM son causadas por alteraciones moleculares en genes que codifican proteínas estructurales del músculo esquelético o proteínas necesarias para la estabilidad, mantenimiento y correcto funcionamiento de las fibras musculares (Wallace and McNally, 2009). Recién durante las últimas 3 décadas, gracias al descubrimiento de las bases genéticas de las formas más comunes de DM, se ha podido mejorar la categorización de los cuadros clínicos. Fue gracias al avance en la comprensión de los mecanismos fisiológicos y moleculares subyacentes a las DM que se logró el establecimiento de consensos internacionales para el manejo clínico y diagnóstico de las mismas, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y la mejora en los estándares de cuidado de los pacientes.

La confirmación del diagnóstico clínico presuntivo de pacientes con DM consiste en la identificación de la mutación(es) causante(s) de la patología mediante estudios moleculares. Por tal motivo y su actual amplia disponibilidad, los estudios moleculares constituyen la herramienta "Gold Standard" para el diagnóstico de las DM. Recientemente, gracias al advenimiento de las tecnologías de secuenciación masiva se está logrando avanzar en la identificación de nuevos genes asociados a estas enfermedades. Es por ello que el listado actualizado de genes asociados a DM es publicado anualmente en "The Gene Table of Monogenic Neuromuscular Disorders".

Nuestro laboratorio cuenta con casi 30 años de experiencia en el diagnóstico molecular y asesoramiento genético de las Distrofinopatías, las cuales constituyen el subgrupo más frecuente dentro de las DM. Estas son enfermedades monogénicas, de herencia recesiva ligada al cromosoma X y originadas por alteraciones moleculares en el gen *DMD* (Hoffman *et al*., 1987; Koenig *et al*., 1988). Si bien teóricamente las Distrofinopatías pueden ser subdivididas en 3 claros cuadros clínicos (Distrofia Muscular de Duchenne [DMD], Distrofia Muscular de Becker [DMB] y Cardiomiopatía Dilatada ligada al Cromosoma X), en realidad constituyen un espectro continuo de severidad. Brevemente, DMD es una miopatía severa que resulta de la ausencia de la proteína distrofina, producto del gen *DMD*, y afecta a 1 de 3.500-5.000 varones nacidos vivos (Mendell *et al*., 2012). En cambio, DMB presenta un patrón sintomatológico más leve o una tasa de progresión más lenta que DMD y afecta a 1:18.000 varones nacidos vivos.

Los cuadros de Distrofinopatías suelen ser confundidos con otras etiologías de tipo DM, especialmente las llamadas DM de Cinturas. Esto se explica por 3 motivos: el solapamiento de síntomas entre las distintas DM, el espectro fenotípico continuo de las Distrofinopatías y resultados similares en los estudios histológicos de biopsia muscular. Se han reportado casos de biopsias con inmunomarcación negativa para distrofina en pacientes con alteraciones moleculares en genes asociados a DM de Cinturas, lo cual se explica por una disminución secundaria de la proteína analizada (Yamamoto *et al*., 2008).

Por todo lo anteriormente mencionado, el objetivo principal del proyecto consistió en ampliar la línea de trabajo de nuestro laboratorio a todas las DM, enfocándonos principalmente a las DM de Cintura, de modo de acercar el diagnóstico genético/molecular a un mayor número de pacientes y brindar asesoramiento genético a las familias afectadas. A su vez, dicha meta constó de 5 objetivos específicos: 1. Instaurar el algoritmo molecular diagnóstico para otras DM, distintas de las Distrofinopatías; 2. Identificar alteraciones moleculares en genes asociados a DM; 3. Cuando fuera posible, validar el posible efecto patogénico de variantes de significado incierto (VUS) halladas en pacientes con DM; 4. Establecer una correlación entre el genotipo y el fenotipo; y, 5. Caracterizar la población argentina afectada con estas patologías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes: Se analizaron en total 167 pacientes, 152 contaron con un diagnóstico clínico presuntivo de Distrofinopatía, sin grandes alteraciones moleculares en el gen *DMD,* y 15 con un cuadro clínico de otras enfermedades neuromusculares. Cuando fue posible, se incluyeron otros miembros de la familia para el análisis de segregación de las variantes y estudios de detección de portadores. Los pacientes presentaron al menos 1 de los siguientes síntomas: dificultad para caminar y/o subir escaleras, debilidad muscular progresiva, niveles elevados de las enzimas CPK y hallazgos histológicos típicos de DM en la biopsia muscular. Los pacientes fueron derivados de distintos centros médicos del país, donde fueron informados acerca de los estudios a realizarse y firmaron el consentimiento informado.

Muestras: Se purificó ADNg de leucocitos de sangre periférica empleando el método de CTAB. El ADNg fue cuantificado por espectrofotometría a A260nm y su calidad se determinó mediante los cocientes A260nm/A280nm y A260nm/A230nm.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA): Se utilizó el kit comercial de MLPA [MRC Holland (www.mlpa.com)] para la búsqueda de grandes deleciones y duplicaciones (≥1 exón). Se usaron las salsas PO34 y PO35 (*DMD*) para el diagnóstico de Distrofinopatías y la salsa P166 (*SGCA, SGCB, SGCD, SGCG* y *FKRP*) para las DM de Cinturas. El ensayo se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos se corrieron en un secuenciador automático para fragmentos [Servicio de Macrogen] con 500Liz como standard interno. Los resultados se analizaron con los programas GeneMarker y Coffalyser. Las alteraciones de 1 único exón fueron corroboradas mediante una metodología alternativa o, en los casos donde esto no fue posible, mediante 2 ensayos independientes arrojando el mismo resultado.

Secuenciación de Exoma Completo: Se empleó esta metodología para la identificación de pequeñas variantes de secuencia y fue llevada a cabo por el servicio de Macrogen. Se utilizó el método de captura por hibridación Agilent SureSelect V5 Target Enrichment Kit y la plataforma Illumina Novaseq. Las lecturas obtenidas fueron alineadas contra la secuencia de referencia del Genoma Humano (GRCh38) con la herramienta informática BWA. La identificación, anotación y filtrado de variantes de secuencia se llevó a cabo empleando los siguientes programas y bases de datos: Picard, Genome Analysis Toolkit (GATK), SnpEff, dbSNP, 1000Genomes Phase 3, ClinVar y ESP. Finalmente, la cobertura y la calidad de las lecturas obtenidas para cada uno de los exones de los genes de interés fueron determinadas mediante el análisis de los archivos BAM con el software IGV.

Selección de variantes patogénicas: La estrategia empleada para el análisis de los resultados del exoma dependió de la clínica del paciente, pero en la mayoría de los casos consistió en 3 etapas. En la primera se buscaron alteraciones moleculares en *DMD*. Cuando no se hallaron variantes causantes de patología en el gen *DMD*, se prosiguió a analizar todos los genes del grupo 1 de la "Gene Table of Neuromuscular Disorders" (Bonne *et al*., 2018; Benarroch *et al*., 2019). Cuando no se identificaran variantes patogénicas con este segundo panel, se continuó con el análisis de todos los genes de la tabla previamente mencionada. Debe destacarse que en los casos de pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de otras enfermedades neuromusculares, el primer paso de análisis del exoma fue obviado, empleándose directamente el panel pertinente al fenotipo del paciente.

Las variantes de secuencia identificadas en el estudio de exoma fueron clasificadas en 5 categorías (benignas, probablemente benignas, VUS, probablemente patogénicas y patogénicas) siguiendo las guías internacionales del American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Richards *et al*., 2015). Brevemente, la clasificación de las variantes se basó en la información recolectada respecto a: 1) Tipo y efecto de la alteración molecular; 2) Frecuencia poblacional en consorcios de secuenciación como 1000Genomas y gnomAD [https://gnomad.broadinstitute.org/]; 3) Bases de datos gen-específicas como ser Leiden open variation database (LOVD) [http://www.lovd.nl/3.0/home/] and ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/); 4) Análisis predictivo in silico con softwares tales como PolyPhen-2 [http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/], SIFT [http://sift.jcvi.org/], Mutation Taster [http://www.mutationtaster.org/], Mutation Assessor [http://mutationassessor.org/r3/], CADD [http://cadd.gs.washington.edu/], UMD Predictor [http://umd-predictor.eu/analysis.php], Human Splicing Finder [https://www.genomnis.com/access-hsf], etc.; 5) Correlación entre los rasgos fenotípicos observados y esperados; 6) Segregación familiar; y, 7) Ensayos funcionales reportados.

PCR-Secuenciación de Sanger: Esta técnica fue empleada para la validación de las pequeñas variantes de secuencia patogénicas halladas por exoma, su segregación intrafamiliar y la corroboración de las deleciones de un único exón identificadas por MLPA. Para ello, se diseñaron primers específicos flanqueando el exón a analizar. La amplificación por PCR se realizó en base a lo descripto previamente. Los productos fueron secuenciados con ambos primers [Servicio de Macrogen]. Se evaluó la calidad de la secuencia con el software Finchtv y se analizaron los resultados por comparación con la secuencia de referencia del gen en estudio.

RESULTADOS

El "Laboratorio de Distrofinopatías" es reconocido como centro de referencia de Argentina en el diagnóstico de estas patologías, es por ello que pacientes de distintos centros médicos del país fueron derivados, principalmente, con un diagnóstico clínico presuntivo de Distrofinopatía. Siguiendo las guías internacionales para el diagnóstico molecular de Distrofinopatía, se comenzó con la búsqueda de grandes alteraciones moleculares (≥1 exón) en el gen *DMD* (Fratter *et al*., 2020). Un total de 152 individuos debió recurrir al estudio de secuenciación de exoma completo, como consecuencia de la ausencia de grandes deleciones y duplicaciones en *DMD*. Entre ellos, 119 alcanzaron un diagnóstico genético/molecular de Distrofinopatía, gracias al hallazgo de pequeñas variantes de secuencia causantes de patología en *DMD*. Para los individuos restantes (33) y los 15 derivados con un diagnóstico clínico presuntivo de otra clase de enfermedad neuromuscular, se debió ampliar la búsqueda de alteraciones moleculares a otros genes asociados a estas patologías, los cuales fueron seleccionados en base a la clínica del paciente (Bonne *et al*., 2018; Benarroch *et al*., 2019).

Empleando las reglas de la ACMG para la clasificación de variantes, se identificaron alteraciones moleculares patogénicas, probablemente patogénicas y/o VUS en 16 genes que explicarían el fenotipo de 33 pacientes (Tabla 1). Entre estos individuos, se distinguen 6 con variantes en *FKRP*, 1 en *FKTN*, 6 en *CAPN3*, 2 en *POMT2*, 1 en *POMT1*, 3 en *SGCA*, 1 en *SGCB*, 2 en *SGCG*, 1 en *SYNE2*, 3 en *COL6A1*, 1 en *COL6A2*, 2 en *COL6A3*, 1 en *PHKA1*, 1 en *LMNA*, 1 en *GMPPB* e, interesantemente, 1 con variantes en *LMNA* y *ANO5*. La amplia mayoría de estos genes se encuentran asociados a cuadros de DM de cinturas, mientras que los restantes se asocian a cuadros de DM de Emery-Dreifuss, Miopatía de Bethlem/DM congénita de Ullrich, entre otros.

Resulta interesante profundizar el análisis del paciente portador de 2 alteraciones moleculares de tipo *missense* en estado heterocigota y clasificadas como patogénica/probablemente patogénica en 2 genes distintos asociados a cuadros de DM (#1234). Uno de estos genes, *LMNA*, se asocia a cuadros de DM de Emery-Dreifuss de herencia dominante y recesiva, por lo cual el hallazgo de una única variante patogénica puede explicar el fenotipo del paciente. En cambio, la variante probablemente patogénica mapea en el gen *ANO5*, el cual sólo se asocia a cuadros de DM de cinturas de herencia recesiva. Esto indica que faltaría una segunda alteración molecular en este gen para explicar la presencia de patología, la cual podría no ser detectada por la metodología empleada. No obstante, no se puede descartar que el cuadro clínico del paciente sea consecuencia de un efecto aditivo de ambas variantes halladas ni que el cuadro de DM de Emery-Dreifuss se vea modificado o empeorado por la alteración molecular en el *ANO5*.

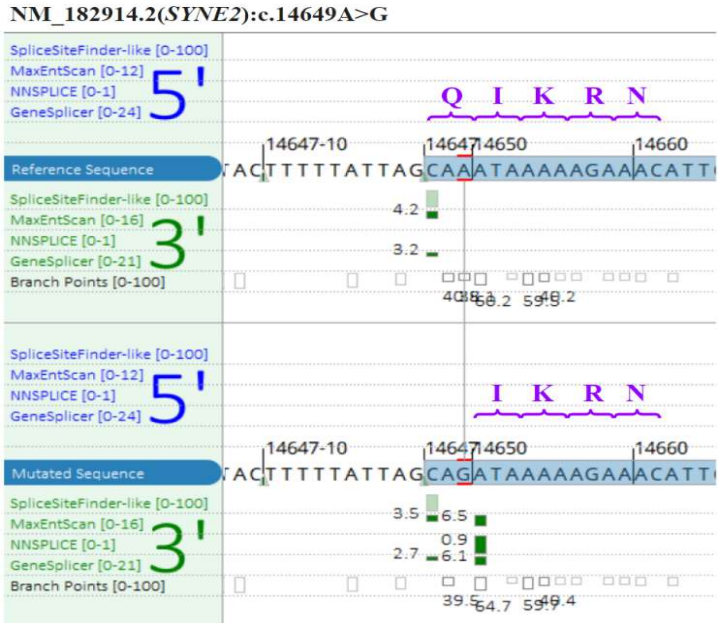


Figura 1. Análisis del impacto de la variante c.14649A>G (*SYNE2*) sobre el proceso de *splicing*. Los cuadrados pequeños verdes denotan la fuerza de un dado nucléotido para funcionar como aceptor del *splicing* y las letras violetas denotan los aminoácidos codificados por los codones señalizados por las llaves. En la parte superior se muestra la secuencia de referencia, donde la primer C del exón funcionaría como aceptor. En la parte inferior, se observa la secuencia del paciente, donde la segunda A del exón gana una mayor fuerza para actuar como aceptor que la posición *wild-type*.

Se hallaron 48 alteraciones moleculares distintas en estos 16 genes, entre ellas 1 deleción de 2 exones detectada por MLPA y 47 variantes de secuencias pequeñas detectadas por secuenciación de exoma completo. Entre estas últimas, se distinguen 37 sustituciones, 8 deleciones y 2 duplicaciones. Las sustituciones resultaron preferentemente ser de tipo *missense* (32), 1 fue de tipo *nonsense*, 2 afectaron los sitios canónicos de *splicing* (posiciones ±1 o ±2 del intrón) y las restantes 2 afectaron sitios no canónicos de *splicing*. Llamativamente, en ambos casos, estás últimas sustituciones afectaron la posición +5 del intrón.

En general, se considera que el efecto patogénico de las variantes de tipo *missense* radica en la alteración del correcto plegamiento de la proteína o su interacción con otras moléculas (otras proteínas, co-enzimas, iones, etc.). Sin embargo, el análisis bioinformático de 3 variantes *missense* sugiere que su efecto deletéreo se explica por alterar el proceso de *splicing* en lugar de por el cambio aminoacídico *per se*. La figura 1 muestra el ejemplo de la variante NM_182914.2(*SYNE2*):c.14649A>G, donde la sustitución generaría un sitio aceptor alternativo a 3 nucleótidos del comienzo del exón y, por ende, la pérdida de un codón/aminoácido en la proteína.

La mitad de los pacientes con alteraciones moleculares en *FKRP*, presentaron las mismas dos variantes NM_024301.4:c.946C>G y c.970G>C, clasificadas respectivamente como patogénica y VUS. El análisis de las lecturas por IGV determinó que ambas alteraciones moleculares mapean en el mismo alelo, lo cual se condice con la presencia de una tercera variante probablemente patogénica en ambos individuos que portaban estas alteraciones en estado heterocigota. Cabe destacarse que estas variantes no han sido reportadas en consorcios de secuenciación y sólo han sido observadas en la cohorte argentina, tanto en nuestro laboratorio como en el servicio de genética del Hospital Garrahan (Lubieniecki *et al.*, 2014). Esto sugiere que el haplotipo NM_024301.4:c.[946C>G;970G>C] se ha originado en la región de nuestro país o la ocurrencia de un proceso evolutivo de efecto fundador.

Los estudios de segregación intrafamiliar pueden servir diversos objetivos: 1) Validar la patogenicidad de una alteración molecular, gracias a la presencia de dicha variante en otros individuos afectados de la familia y la ausencia de la misma en los individuos sanos; 2) Determinar si las variantes halladas en un mismo gen se encuentran en el mismo alelo (*Cis*) o en alelos distintos (*Trans*), lo cual se logra fácilmente al ver que las variantes han sido heredadas de distintos parentales; y, 3) Determinar el estado de portador de las variantes de secuencia halladas en otros miembros de la familia. En este proyecto se pudo realizar segregación intrafamiliar de la variante hallada en 11 casos, en 4 de ellos se estudiaron hermanos afectados, en 5 padres clínicamente sanos y en 2 los hijos de los pacientes en cuestión.

En todos los casos donde se analizaron hermanos afectados, se observó que ellos también portaban la variante de secuencia candidata, lo cual apoya aún más su asociación al desarrollo de patología. Entre ellos, cabe destacarse el caso #929, donde se vio que ambos hermanos afectados comparten una deleción de 15 nucleótidos en *LMNA* pero que ninguno de los padres porta dicha alteración molecular en su ADNg de sangre periférica (Tabla 1 y Figura 2A). Estos hallazgos no sólo sugieren que la variante surgió *de novo*, sino también que uno de los padres es un mosaico germinal para dicha deleción. Esta información resulta fundamental para el asesoramiento genético de la pareja al momento de querer tener más hijos.

En los restantes 4 estudios de segregación realizados con las muestras de los padres, se pudo determinar de qué parental fue heredada cada variante y, por ende, establecer su estado de portador. En 3 casos donde se analizaron patologías de herencia recesiva, se pudo confirmar que ambas variantes de secuencia se encontraban en *trans*, siendo ambos padres portadores (Tabla 1 y Figura 2B-C). Entre ellos resulta interesante el caso #656, donde se halló en el paciente una alteración molecular en estado homocigota, no reportada en consorcios de secuenciación como GnomAD o 1000Genomas pero portadas por ambos parentales (Tabla 1). El resultado de la segregación sumado a la frecuencia alélica nula de la variante, sugiere la existencia de endogamia en dicha familia. Por otro lado, el caso restante (#713) se trataba de una patología de herencia recesiva ligada al cromosoma X, donde se pudo confirmar que la variante fue heredada por línea materna.

Finalmente, en ambos casos donde se analizaron las hijas de los pacientes, se determinó que ellas compartían la variante patogénica con sus padres. Dado que es altamente probable que en ambos casos de trate de patologías de herencia dominante, este hallazgo no sólo implica que son portadoras sino también la necesidad de controles regulares para detectar tempranamente la aparición de signos y síntomas.

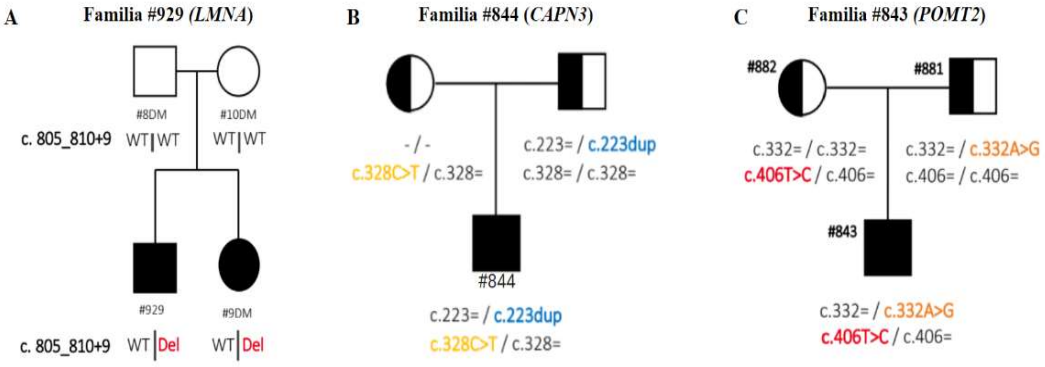


Figura 2. Ejemplos de segregación intrafamiliar de las variantes patogénicas identificadas en 3 genes asociados a enfermedades neuromusculares (A) *LMNA*, (B) *CAPN3* y (C) *POMT2*.

DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente proyecto fue instaurar el diagnóstico de otras enfermedades neuromusculares, de forma de sumarlo al diagnóstico de Distrofinopatías que es proporcionado por nuestro laboratorio desde 1994. Para ello, dado que estos genes se ven principalmente afectados por pequeñas variantes de secuencia, se instauró el análisis de los resultados de exoma completo mediante paneles *in silico* conformados por los genes asociados a enfermedades neuromusculares descriptos hasta el momento que pudieran explicar el fenotipo del paciente. Además, con el fin de completar los casos donde una única variante patogénica fuera identificada, se agregó el análisis de MLPA para DM de cinturas.

Puesto que nuestro laboratorio es reconocido por los neurólogos del país como centro de diagnóstico molecular de distrofinopatías, gran parte de los pacientes incluidos en el presente estudio fueron varones derivados por sospecha clínica de estas patologías. Es por este motivo que el 78.3% de los individuos que recurrieron al estudio de exoma portaron alteraciones moleculares patogénicas en *DMD*. Sin embargo, la ampliación del análisis de estudio de exoma permitió diagnosticar otros 18 individuos con diversas clases de enfermedades neuromusculares. Debe destacarse que no resulta sorprendente hallar variantes causantes de patología en otros genes asociados a enfermedades neuromusculares, dado que existe un amplio solapamiento de signos y síntomas entre las distintas clases de DM (Yamamoto *et al*., 2008). Desafortunadamente, los restantes 15 pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de Distrofinopatía no portaron alteraciones moleculares patogénicas en *DMD* ni en otros genes asociados a DM. Por ende, no se puede excluir que tengan DMD puesto que pueden portar variantes no captadas por la metodología empleada, como ser variantes intrónicas profundas, variantes en zonas regulatorias, inversiones, etc.

Gracias al presente proyecto, se alcanzaron en total 33 diagnósticos moleculares para distintas enfermedades neuromusculares. Esto demuestra que el objetivo principal del estudio ha sido cumplido. Los resultados de estos estudios no sólo permitieron terminar con la odisea diagnóstica, sino que también ayudaron a detectar individuos portadores en la familia y, por ende, brindar asesoramiento genético. A su vez, conocer el gen implicado en la patología tiene un impacto directo en el tratamiento, dado que los diferentes cuadros clínicos tienen distintos estándares de cuidados. Por ejemplo, los pacientes con Distrofinopatías son normalmente tratados con corticosteroides puesto que se ha probado que retrasan la pérdida de la deambulación, mientras que los corticosteroides no son recomendados para el tratamiento de otras enfermedades neuromusculares debido a la falta de evidencia que apoye su eficacia y beneficio (Walter *et al.*, 2013; Albuquerque *et al.*, 2014; Bello *et al.*, 2015). Además, nuevas terapias génicas gen-dependientes están en investigación, las cuales requieren confirmación molecular del gen afectado en el paciente [https://www.sarepta.com/science/gene-therapy-engine].

El presente proyecto constituye el comienzo de la caracterización genético/molecular de la población argentina afectadas con enfermedades neuromusculares distintas a las Distrofinopatías. Si bien el número de casos analizados es bajo, ya se vislumbra una preponderancia de los genes *FKRP* y *CAPN3* a estar asociados a la presencia de patología en los individuos de nuestra población. Además, se detectaron 7 variantes nóveles en 6 genes (*FKRP, SYNE2, SGCA, COL6A2, PHKA1* y *LMNA*). Incluso se halló un haplotipo conformado por dos variantes en el gen *FKRP* que sería originario de la región de nuestro país. Estas últimas dos observaciones demuestran la existencia de variantes de secuencia específicas de nuestra etnia.

Finalmente, esperamos que la entrega de resultados diagnosticando pacientes por fuera de *DMD* y la publicidad que venimos realizando con los distintos neurólogos del país, colabore a aumentar el número de pacientes derivados a nuestro laboratorio por diagnóstico clínico presuntivo de otros tipos de enfermedades neuromusculares. De este modo, poder brindar diagnóstico molecular a un mayor número de familias afectadas, lo cual constituye el elemento clave para terminar con la estresante y dolorosa odisea diagnóstica, obtener asesoramiento genético y llevar a cabo un informado planeamiento familiar. Por último, esto permitirá ampliar la casuística necesaria para profundizar la caracterización genético/molecular de estas enfermedades en nuestro país.

Tabla 1. Resultados de los pacientes con variantes en genes asociados a otras DM y análisis de las alteraciones moleculares.

Gen	Cuadro clínico (Herencia)	Mtra	Variante nivel genómico	Variante nivel proteico	Identificador de SNPs (rs)	Cigosis	ACMG	Fr. al. gnomad-ALL	Fr. al. gnomad-LATINO	LOVD (n° de reportes)	Clinvar (n° de reportes)	Softwares predictores	Segregación intrafamiliar	Comentarios
FKRP (19q13.32)	DM de cinturas 2I (Autosómico Recesivo)	#323	NM_024301.4: c.826C>A	NP_077277.1: p.Leu276Ile	rs28937900	HET	PAT.	0,001104	0,0002568	Ppal. Pat. (375)	Ppal. Pat. (39)	6 Pat.: 4 VUS: 13 Ben.	No	---
			NM_024301.4: c.1384C>T	NP_077277.1: p.Pro462Ser	rs768606230	HET	PAT.	0,000009037	0	Ppal. Pat. (15)	Pat./Prob. Pat. (6)	17 Pat.: 7 VUS: 1 Ben.		
		#618	NM_024301.4: c.677C>A	NP_077277.1: p.Thr226Asn	---	HET	PROB. PAT.	---	---	VUS (1)	VUS (2)	10 Pat.: 11 VUS: 4 Ben.	No	---
			NM_024301.4: c.946C>G	NP_077277.1: p.Pro316Ala	---	HET	PAT.	---	---	Pat./Prob. Pat. (3)	Prob. Pat./VUS (2)	17 Pat.: 8 VUS		Variantes en Cis
			NM_024301.4: c.970G>C	NP_077277.1: p.Glu324Gln	rs886044183	HET	VUS	---	---	VUS (2)	VUS (2)	10 Pat.: 7 VUS: 7 Ben.		
		#1012	NM_024301.4: c.946C>G	NP_077277.1: p.Pro316Ala	---	HOM	PAT.	---	---	Pat./Prob. Pat. (3)	Prob. Pat./VUS (2)	17 Pat.: 8 VUS	No	Variantes en Cis
			NM_024301.4: c.970G>C	NP_077277.1: p.Glu324Gln	rs886044183	HOM	VUS	---	---	VUS (2)	VUS (2)	10 Pat.: 7 VUS: 7 Ben.		
		#825	NM_024301.4: c.478G>T	NP_077277.1: p.Val160Phe	---	HET	VUS	---	---	Pat. (5)	VUS (1)	11 Pat.: 5 VUS: 10 Ben.	No	---
			NM_024301.4: c.941C>T	NP_077277.1: p.Thr314Met	rs398124395	HET	PAT.	---	---	Ppal. Pat. (16)	Pat. (6)	16 Pat.: 8 VUS: 1 Ben.		
		#369	NM_024301.4: c.946C>G	NP_077277.1: p.Pro316Ala	---	HET	PAT.	---	---	Pat./Prob. Pat. (3)	Prob. Pat./VUS (2)	17 Pat.: 8 VUS	No	Variantes en Cis
			NM_024301.4: c.970G>C	NP_077277.1: p.Glu324Gln	rs886044183	HET	VUS	---	---	VUS (2)	VUS (2)	10 Pat.: 7 VUS: 7 Ben.		
			NM_024301.4: c.1086C>A	NP_077277.1: p.Asp362Glu	---	HET	PROB. PAT.	---	---	VUS (1)	VUS (1)	13 Pat.: 6 VUS: 6 Ben.		---
		#933	NM_024301.4: c.236T>G	NP_077277.1: p.Val79Gly	---	HET	PROB. PAT.	---	---	---	---	10 Pat.: 12 VUS: 4 Ben.	Variantes compartidas con la hermana afectada	---
			NM_024301.4: c.826C>A	NP_077277.1: p.Leu276Ile	rs28937900	HET	PAT.	0,001104	0,0002568	Ppal. Pat. (375)	Ppal. Pat. (39)	6 Pat.: 4 VUS: 13 Ben.		
FKTN (9q31.2)	DM de Cinturas 2M (Autosómico recesivo)	#735	NM_001079802.1:c.780+2T>A	---	---	HET	PAT.	---	---	Pat. (1)	Prob. Pat. (1)	6 Pat.: 2 VUS	No	Pérdida de sitio dador de splicing
			NM_001079802.1:c.1205C>T	NP_001073270.1:p.Thr402Ile	rs371464705	HET	VUS	---	---	VUS (1)	VUS (2)	5 Pat.s: 20 VUS		---
CAPN3 (15q15.1)	DM de Cinturas 1I (Autosómico dominante) DM de Cinturas 2A (Autosómico recesivo)	#1188	NM_000070.2: c.550del	NP_000061.1: p.(Thr184Argfs*36)	rs80338800	HET	PAT.	0,0002298	0	Ppal. Pat. (375)	Pat. (33)	---	No	---
			NM_000070.2: c.1468C>T	NP_000061.1: p.Arg490Trp	rs141656719	HET	PAT.	0,00009557	0,000113	Ppal. Pat. (79)	Pat./Prob. Pat. (20)	16 Pat.: 6 VUS: 3 Ben.		
		#1184	NM_000070.2: c.1342C>T	NP_000061.1: p.Arg448Cys	rs776043976	HET	PAT.	0,000004241	0	Ppal. Pat. (24)	Pat. (9)	18 Pat.: 8 VUS	Variantes compartidas con la hermana afectada	---
			NM_000070.2: c.2314_2317del	NP_000061.1: p.(Asp772Asnfs*3)	rs764086484	HET	PAT.	0,000003977	0	Pat. (9)	Pat. (4)	---		
		#1230	NM_000070.2: c.551C>T	NP_000061.1: p.Thr184Met	rs35889956	HET	VUS	0,003104	0,0008748	Pat./Prob. Pat. (12)	Ben./Prob. Ben. (10)	10 Pat.: 13 VUS: 1 Ben.	No	---
			NM_000070.2: c.2050+1G>C	----	rs768374736	HET	PAT.	0,000003984	0	Pat. (1)	Pat. (1)	6 Pat.: 2 VUS		Pérdida de sitio dador de splicing
		#844	NM_000070.2: c.223dup	NP_000061.1: p.(Tyr75Leufs*5)	rs398123146	HET	PAT.	---	---	Pat. (6)	Pat. (3)	---	Variante paterna	---
			NM_000070.2: c.328C>T	NP_000061.1: p.Arg110*	rs121434545	HET	PAT.	0,000003977	0	Pat. (22)	Pat. (8)	3 Pat.: 5 VUS: 1 Ben.	Variante materna	
		#1165	NM_000070.2: c.328C>T	NP_000061.1: p.Arg110*	rs121434545	HET	PAT.	0,000003977	0	Pat. (22)	Pat. (8)	3 Pat.: 5 VUS: 1 Ben.	No	---
			NM_000070.2: c.945+5G>A	---	rs773547765	HET	VUS	---	---	Pat./VUS (3)	VUS (3)	2 Pat.		Probable pérdida de sitio dador de splicing
		#1075	NM_000070.2: c.620A>C	NP_000061.1: p.Lys207Thr	rs886043108	HET	PROB. PAT.	---	---	Pat./VUS (6)	VUS (3)	23 Pat.: 3 VUS	Variante transmitida a su hija	---
POMT2 (14q24.3)	DM de Cinturas 2N (Autosómico recesivo)	#843	NM_013382.5: c.406T>C	NP_037514.2: p.Tyr136His	---	HET	VUS	---	---	Prob. Pat. (3)	VUS (2)	19 Pat.: 7 VUS	Variante materna	---
			NM_013382.5: c.332A>G	NP_037514.2: p.Lys111Arg	---	HET	PROB. PAT.	---	---	Prob. Pat. (1)	VUS (1)	18 Pat.: 8 VUS: 2 Ben.	Variante paterna	
		#908	NM_013382.5: c.406T>C	NP_037514.2: p.Tyr136His	---	HET	VUS	---	---	Prob. Pat. (3)	VUS (2)	19 Pat.: 7 VUS	No	---
			NM_013382.5: c.295del	NP_037514.2: p.(Arg99Valfs*15)	---	HET	PROB. PAT.	---	---	Pat. (1)	---	---		
POMT1 (9q34.13)	DM de Cinturas 2K (Autosómico recesivo)	#1191	NM_007171.3: c.1565G>A	NP_009102.3: p.Arg522Lys	rs117985576	HET	PROB. BEN.	0,001635	0,001758	Ben./Prob. Ben./VUS (10)	Prob. Ben./VUS (16)	1 VUS: 24 Ben.	No	---
			NM_007171.3: c.1973A>G	NP_009102.3: p.Glu658Gly	rs1322926242	HET	VUS	0,000003978	0,00002891	---	VUS (1)	11 Pat.: 14 VUS: 1 Ben.		

SGCA (17q21.33)	DM de Cinturas 2D (Autosómico recesivo)	#672	NM_000023.2: c.739G>A	NP_000014.1: p.Val247Met	rs143570936	HET	PAT.	0,0001242	0,00008484	Pat./Prob. Pat./VUS (55)	Pat./Prob. Pat. (17)	6 Pat.: 16 VUS: 2 Ben.	Variantes compartidas con la hermana afectada	---
			NM_000023.2: c.(747+1_748-1)_(983+1_984-1)del	NP_000014.1: p.Val250Hisfs*41	---	HET	PAT.	---	---	Pat. (2)	---	---		
		#1404	NM_000023.2: c.229C>T	NP_000014.1: p.Arg77Cys	rs28933693	HET	PAT.	0,0004581	0,00008472	Ppal. Pat. (229)	Pat. (29)	16 Pat.: 9 VUS	No	---
			NM_000023.2: c.355A>G	NP_000014.1: p.Arg119Gly	---	HET	VUS	---	---	---	---	6 Pat.: 10 VUS: 10 Ben.		
		#1446	NM_000023.2: c.229C>T	NP_000014.1: p.Arg77Cys	rs28933693	HOM	PAT.	0,0004581	0,00008472	Ppal. Pat. (229)	Pat. (29)	16 Pat.: 9 VUS	No	---
SGCB (4q12)	DM de Cinturas 2E (Autosómico recesivo)	#656	NM_000232.4: c.753+5G>A	---	---	HOM	PROB. PAT.	---	---	VUS (2)	Prob. Pat./VUS (2)	2 Pat.	Variante materna y paterna	Confirmado por biopsia e inmunohistoquímica. Probable sitio aceptor alternativo a 18pb del inicio del intrón.
SGCG (13q12.12)	DM de Cinturas 2C (Autosómico recesivo)	#501	NM_000231.2: c.525del	NP_000222.1: p.(Phe175Leufs*20)	---	HET	PAT.	0,00005567	0,00008673	Pat. (151)	Pat. (15)	---	No	---
			NM_000231.2: c.623dup	NP_000222.1: p.(Val209Cysfs*11)	---	HET	PROB. PAT.	---	---	Pat. (1)	---	---		
		#624	NM_000231.2:c.195+4_195+7del	NP_000222.1: p.?	rs797045106	HET	PAT.	0,00001061	0	Pat. (10)	Pat. (9)	---	No	Probable pérdida del sitio dador de splicing
			NM_000231.2: c.525del	NP_000222.1: p.(Phe175Leufs*20)	---	HET	PAT.	0,00005567	0,00008673	Pat. (151)	Pat. (15)	---		---
SYNE2 (14q23.2)	DM de Emery-Dreifuss 5 (Autosómico dominante)	#928	NM_182914.2: c.13892G>A	NP_878918.2: p.Gly4631Asp	---	HET	VUS	---	---	---	---	1 Pat.: 12 VUS: 12 Ben.	No	---
			NM_182914.2: c.14649A>G	NP_878918.2: p.Gln4883Gln	---	HET	VUS	---	---	---	---	1 Ben.		Probable sitio aceptor alternativo a 3pb del comienzo del exón
COL6A1 (21q22.3)	Miopatía de Bethlem (Autosómico dominante/recesivo) DM congénita de Ullrich (Autosómico dominante/recesivo)	#749	NM_001848.2: c.1003G>T	NP_001839.2: p.Gly335Trp	---	HET	PAT.	---	---	Prob. Pat. (1)	---	20 Pat.: 7 VUS: 1 Ben.	No	---
		#1364	NM_001848.2: c.859G>A	NP_001839.2: p.Gly287Arg	rs1057521152	HET	PAT.	---	---	Pat./VUS (4)	Pat.s/Prob. Pat. (2)	23 Pat.: 3 VUS: 1 Ben.	No	---
		#1060	NM_001848.2: c.2998G>A	NP_001839.2: p.Glu1000Lys	rs201456885	HET	VUS	---	---	---	VUS (1)	12 VUS: 12 Ben.	No	---
COL6A2 (21q22.3)		#1209	NM_001849.4: c.955-34_978del	NP_001840.3: p.?	---	HET	PROB. PAT.	---	---	---	---	---	No	---
COL6A3 (2q37.3)		#1293	NM_004369.3: c.6221G>A	NP_004360.2: p.Gly2074Asp	---	HET	PAT.	---	---	Pat. (2)	Prob. Pat. (1)	21 Pat.: 3 VUS: 2 Ben.	No	---
		#587	NM_004369.3: c.6158G>A	NP_004360.2: p.Gly2053Asp	---	HET	PAT.	---	---	Pat. (2)	---	20 Pat.: 5 VUS: 3 Ben.	Variante transmitida a su hija	---
PHKA1 (Xq13.1)	Glucogenosis muscular (Lig. al X recesivo)	#713	NM_002637.3: c.3460del	NP_002628.2: p.(Ile1154*)	---	HEM	PROB. PAT.	---	---	---	---	---	Variante materna	---
LMNA (1q22)	DM congénita y DM de Emery-Dreifuss 2 (Autosómico dominantes) DM de Emery-Dreifuss 3 (Autosómico recesivo) etc.	#929	NM_170707.3: c.805_810+9del	NP_733821.1: p.?	---	HET	PROB. PAT.	---	---	---	---	---	Variante compartida con hermana afectada. No presente en los padres.	Confirmado *de novo*
		#1234	NM_170707.3: c.1585G>C	NP_733821.1: p.Ala529Pro	---	HET	PAT.	---	---	---	Prob. Pat. (1)	11 Pat.: 9 VUS: 6 Ben.	No	---
ANO5 (11p14.3)	DM de Cinturas 2L (Autosómico recesivo)		NM_213599.2: c.692G>T	NP_998764.1: p.Gly231Val	rs137854523	HET	PROB. PAT.	0,0009705	0,002686	Pat./Prob. Pat. (46)	Pat./Prob. Pat. (21)	5 Pat.: 12 VUS: 8 Ben.	No	---
GMPPB (3p21.31)	DM de Cinturas 2T (Autosómico recesivo)	#821	NM_021971.4: c.953T>C	NP_068806.1: p.Val318Ala	rs559784211	HET	VUS	0,00001592	0,00008674	Prob. Pat. (1)	Pat./VUS (4)	2 Pat.: 10 VUS: 15 Ben.	No	Probable pérdida del sitio aceptor de splicing
			NM_021971.4: c.860G>A	NP_068806.1: p.(Arg287Gln)	rs202160208	HET	PAT.	0,0002772	0,0000847	Prob. Pat. (10)	Prob. Pat. (17)	1 Pat.: 6 VUS: 18 Ben.		Probable sitio aceptor alternativo dentro del exón

Abreviaturas: Ben.:Benigna; DM:Distrofia Muscular; Fr. Al.: Frecuencia alélica; HEM;Hemicigota; HET: Heterocigota; HOM:Homocigota; Pat.:Patogénica; Prob. Ben.: Probablemente Benigna; Prob. Pat.:Probablemente Patogénica; Ppal.:Principalmente.

BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, M. A. V., Abath-Neto, O., Maximino, J. R., Chadi, G., Zanoteli, E., and Reed, U. C. (2014). Clinical aspects of patients with sarcoglycanopathies under steroids therapy. Arq. Neuropsiquiatr. 72, 768–772.
- Bello, L., Gordish-Dressman, H., Morgenroth, L. P., Henricson, E. K., Duong, T., Hoffman, E. P., et al. (2015). Prednisone/prednisolone and deflazacort regimens in the CINRG Duchenne Natural History Study. Neurology 85, 1048–1055.
- Benarroch, L., Bonne, G., Rivier, F., and Hamroun, D. (2019). The 2020 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome). Neuromuscul. Disord. 29, 980–1018.
- Bonne, G., Rivier, F., and Hamroun, D. (2018). The 2019 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome). Neuromuscul Disord. 28:1031-1063. doi: 10.1016/j.nmd.2018.09.006.
- Fratter, C., Dalgleish, R., Allen, S. K., Santos, R., Abbs, S., Tuffery-Giraud, S., *et al*. (2020). EMQN best practice guidelines for genetic testing in dystrophinopathies. Eur. J. Hum. Genet. 28, 1141–1159.
- Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr, and Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 51, 919–928.
- Koenig, M., Monaco, A. P., and Kunkel, L. M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. Cell 53, 219–228.
- Lubieniecki, F., Monges, S., Mozzoni, J., Moresco, A., Aguerre, V., de Castro, M.F., *et al*. (2014). G.P.275: Expanding the clinical and genetic spectrum of FKRP-related myopathies in Argentinean pediatric patients. Neuromuscul Disord. 24:899-900. doi: 10.1016/j.nmd.2014.06.351.
- Mendell, J. R., Shilling, C., Leslie, N. D., Flanigan, K. M., al-Dahhak, R., Gastier-Foster, J., *et al*. (2012). Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. Ann. Neurol. 71, 304–313.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., *et al*. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet. Med. 17, 405–424.
- Wallace, G. Q., and McNally, E. M. (2009). Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. Annu. Rev. Physiol. 71, 37–57.
- Walter, M. C., Reilich, P., Thiele, S., Schessl, J., Schreiber, H., Reiners, K., *et al*. (2013). Treatment of dysferlinopathy with deflazacort: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. Orphanet J. Rare Dis. 8, 26.
- Yamamoto, L. U., Velloso, F. J., Lima, B. L., Fogaça, L. L. Q., de Paula, F., Vieira, N. M., *et al*. (2008). Muscle protein alterations in LGMD2I patients with different mutations in the Fukutin-related protein gene. J. Histochem. Cytochem. 56, 995–1001.

ABSTRACT

Muscular Dystrophies (MDs) are hereditary disorders that cause weakness and progressive degeneration of skeletal muscles. There is a large overlap between the clinical features of different MDs, which can mislead the clinical diagnosis and, therefore, turn molecular tests into a crucial tool for differential diagnosis. Our laboratory has 30-years of experience in the molecular diagnosis of Dystrophinopathies, the most frequent form of DM. Then, the project´s aim was to broaden the genetic tests provided by our laboratory to all MDs, in order to deliver genetic/molecular diagnosis to a greater number of Argentinian patients.

Were included 167 patients with clinical diagnosis of MDs. Mutational screening was performed by MLPA, WES and Sanger sequencing. WES results were analyzed using *in silico* panels, entailing sets of MD-associated genes that could explain the patient´s phenotype.

We were able to confirmed diagnosis of Dystrophinopathy in 119/152 cases. Additionally, pathogenic, probably pathogenic and/or VUS variants were identified in 16 genes that would explain the phenotype of 33 patients. Once the candidate variants were identified, we could performed segregation studies in 11 cases.

Despite the low number of cases, there is a preponderance of *FKRP* and *CAPN3* to be involved in the pathology of the individuals from our population. Additionally, we detected 7 novel variants and the existence of a 2-variant *FKRP* haplotype that seems to be specific of our cohort.

Thanks to this project 33 genetic/molecular diagnoses were achieved for different MDs, demonstrating that our objective was achieved. These results constitute the end of the diagnostic odyssey, contributed to detect carrier individuals and provide genetic assessment. Furthermore, the identification of the disease causing gene had a direct impact on treatment selection, since the different disorders have different standards-of-care. Finally, the project initiated the genetic/molecular characterization of the Argentine population affected with neuromuscular diseases other than Dystrophinopathies.

ROL DEL RECEPTOR A HISTAMINA H4 COMO BIOMARCADOR ASOCIADO AL PRONÓSTICO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Vanina A. Medina [2], Daniela Speisky [1], Mónica A. Táquez Delgado [2], Alejandro Iotti [1], Melisa B. Nicoud [2], Ignacio A. Ospital [2], Félix Vigovich [1], Pablo Dezanzo [1], Glenda Ernst, Juan L. Uriburu [3]

[1] Departamento de Patología, Hospital Británico. [2] Instituto de Investigaciones Biomédicas, Pontificia Universidad Católica Argentina y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
[3] Servicio de Mastología, Hospital Británico

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia y la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer entre las mujeres en todo el mundo[1,2]. El cáncer de mama es heterogéneo y cada subtipo presenta patrones histopatológicos y comportamiento clínico muy diferentes. Dentro de los tumores triple negativos, la gran mayoría corresponde al subtipo clasificado molecularmente como tipo basal. El cáncer de mama triple negativo (CMTN) representa alrededor del 10 al 20 % de todos los cánceres de mama y se considera el subtipo más agresivo, ya que carece de receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y HER2[3,4]. Está asociado a un alto grado nuclear, una mayor incidencia de metástasis y un corto intervalo sin recurrencia lo que demuestra su mal pronóstico. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de mejorar los tratamientos en el CMTN, basándose en la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan identificar potenciales pacientes para una terapia personalizada[3,4].

El sistema histaminérgico es una de las vías biológicas más interesantes y complejas implicadas en el desarrollo del cáncer. En el cáncer de mama y particularmente en el CMTN, la expresión de H_4R ha sido caracterizada en diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, demostrando su papel crítico en la regulación de la proliferación, el desarrollo y la progresión tumoral. La administración de histamina o agonistas del H_4R disminuyó el crecimiento tumoral en modelos experimentales preclínicos de CMTN inmunodeficientes e inmunocompetentes[5–8.] El análisis de los datos del TCGA mostró que la expresión del gen H_4R está alterada en tumores primarios en comparación con tejido normal en diferentes tipos de cáncer[9,10] Sin embargo, la expresión de H_4R en CMTN y su valor pronóstico es completamente desconocida.

En el presente estudio exploratorio, comparamos la expresión de H_4R en los subtipos de cáncer de mama utilizando datos disponibles en TCGA y correlacionamos la expresión del ARNm del H_4R con parámetros clínicos, luego corroboramos los datos transcriptómicos analizando el estado del H_4R en muestras de pacientes de CMTN en relación con parámetros clínico-patológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de datos in sílico: se utilizó la plataforma *cBioPortal for Cancer Genomics* para extraer datos genómicos y analizar la correlación entre la expresión del H_4R y parámetros clínicos. Se utilizó el conjunto de datos TCGA de cáncer de mama (BRCA) Pan-Cancer Atlas (n = 1072) (http://www.cbioportal.org ; http://www.cancer.gov/tcga). Las correlaciones entre la supervivencia de pacientes con cáncer de mama y la expresión de H_4R (Set de datos: 221170_at) se analizaron mediante la herramienta *KM plotter* (http://kmplot.com [11]).

Selección de pacientes: Se realizó un estudio retrospectivo en muestras provenientes de 30 pacientes femeninas con CMTN, sometidas a cirugía en el Hospital Británico de Buenos Aires entre enero 2005 y diciembre de 2013. Los datos clínicos, demográficos e histopatológicos registrados se describen en la Tabla 1. Se obtuvieron datos de supervivencia en 23 pacientes en un período de 24 meses y durante ese período, 5 pacientes murieron debido al cáncer de mama y 18 sobrevivieron. La mayoría de los pacientes (n=25; 83,3%) se sometió a terapias adicionales (quimioterapia y/o radioterapia adyuvante). Se excluyeron pacientes masculinos con cáncer de mama, lesiones benignas y tumores de mama no epiteliales. No se utilizaron muestras mal conservadas o con necrosis extensa.

El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por la junta de revisión institucional del Hospital Británico (CRIHB #925).

Expresión del H_4R en líneas celulares de CMTN por inmunocitoquímica: Se evaluó la expresión del H_4R en las líneas de CM humanas MDA-MB-231 y MCF-7 (Control negativo: línea celular humana HEK293 derivada de células de riñón embrionario humano). Se utilizó el anti-H4R primario de conejo (1:100, número de catálogo PA5-33850; Invitrogen, ThermoFisher Scientific). La inmunorreactividad se detectó utilizando el kit universal Peroxidasa Vectastain Elite ABC-HRP, según las instrucciones del fabricante. Las células se tiñeron con hematoxilina y se visualizaron mediante microscopía óptica (Axiolab Karl Zeiss; Göttingen, Alemania). La expresión de H_4R se evaluó adicionalmente mediante citometría de flujo como se describió anteriormente[12]. Usamos un anticuerpo primario de conejo anti-H4R (1:100, cat. no ab97487; Abcam) seguido de un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC (1:80, cat. no F0382; Sigma Chemical Co., MO). Las muestras se procesaron en un citómetro de flujo BD Accuri C6 (BDB) y los datos se analizaron utilizando el software BD Accuri C6 (BDB).

Análisis histopatológicos e inmunohistoquímicos: Se evaluaron cortes de tejido incluidos en parafina y fijados con formalina de muestras representativas de carcinomas y tejido mamario histopatológicamente normal adyacente. La clasificación histológica y la estadificación TNM se determinó de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)[13,14]. Los tumores se clasificaron en *bajo grado* (grados 1 o 2) y *alto grado* (grado 3) [15]. Se utilizaron anticuerpos monoclonales de conejo dirigidos contra ER (clon SP1, 1:100; Cell Marque), PR (clon Y85, 1:30; Cell Marque), HER2 (Her2/Neu, clon SP3, 1:300; Cell Marque) y Ki67 (clon SP6, 1:200; Cell Marque). Los *scores* de inmunomarcación para ER, PR y HER2 se determinaron de acuerdo con las pautas de la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica (ASCO) y el Colegio de Patólogos Estadounidenses (CAP). El umbral para la definición de CMTN fue <1% de

inmunopositividad de ER o PR, y un *score* de 0 o 1+ para la expresión de HER2 o 2+ en ausencia de amplificación mediante hibridación fluorescente in situ[15]

Expresión de H4R en tumores y tejido peritumoral: Las muestras se incubaron con anticuerpo policlonal primario de conejo anti-H4R (1:100, número de cat. PA5-33850; Invitrogen). La inmunomarcación se detectó utilizando el kit universal Peroxidasa Vectastain Elite ABC-HRP, según las instrucciones del fabricante. El *score* de inmunomarcación del H_4R se obtuvo multiplicando la intensidad (negativa, 0; débil, 1; moderada, 2; y fuerte, 3) por el porcentaje de células teñidas. La expresión de H_4R se consideró "positiva" si al menos el 5% de las muestras celulares mostraban tinción citoplásmica membranosa y/o granular. La visualización se realizó con un microscopio óptico Leica ICC50 HD (Wetzlar, Alemania). Las fotografías se tomaron con un aumento de 100 × y 400 × con una cámara Leica (Alemania) y se visualizaron con el software Leica LAS EZ (v3.1.0; Leica Microsystem, Suiza).

A continuación, en la Tabla 1se muestran las características clinicopatológicas de las pacientes CMTN

Table 1. Clinicopathological Characteristics of the TNBC Patients.

Population	Variables	Patient Number, *N*=30	Proportion (%)
Clinical features			
Age (years)	Mean/Range	52.3 (25–69)	
Tumor laterality	Right breast	12	40
	Left breast	18	60
Tumor focality	Unifocal	21	70
	Multifocal	9	30
Type of surgery	Breast conserving surgery	23	76.7
	Mastectomy	7	23.3
Pathological features			
Size (cm)	Mean/Range	2.06 (0.4–4.5)	
Histopathology	Invasive ductal carcinoma	26	86.7
	Other type	4	13.3
Histologic grade	High grade	21	70
	Low grade	9	30
Lymphovascular invasion	No	21	70
	Yes	9	30
Accompanying in situ pattern	No	8	26.7
	Yes	22	73.3
Lymph node metastases	No	18	60
	Yes	12	40
Ki67	≤20%	6	20
	>20%	24	80
Histologic stage	I–II	25	83.3
	III	5	16.7
Recurrence	No	24	80
	Yes	6	20

Abbreviation: TNBC, Triple-negative breast cancer.

RESULTADOS

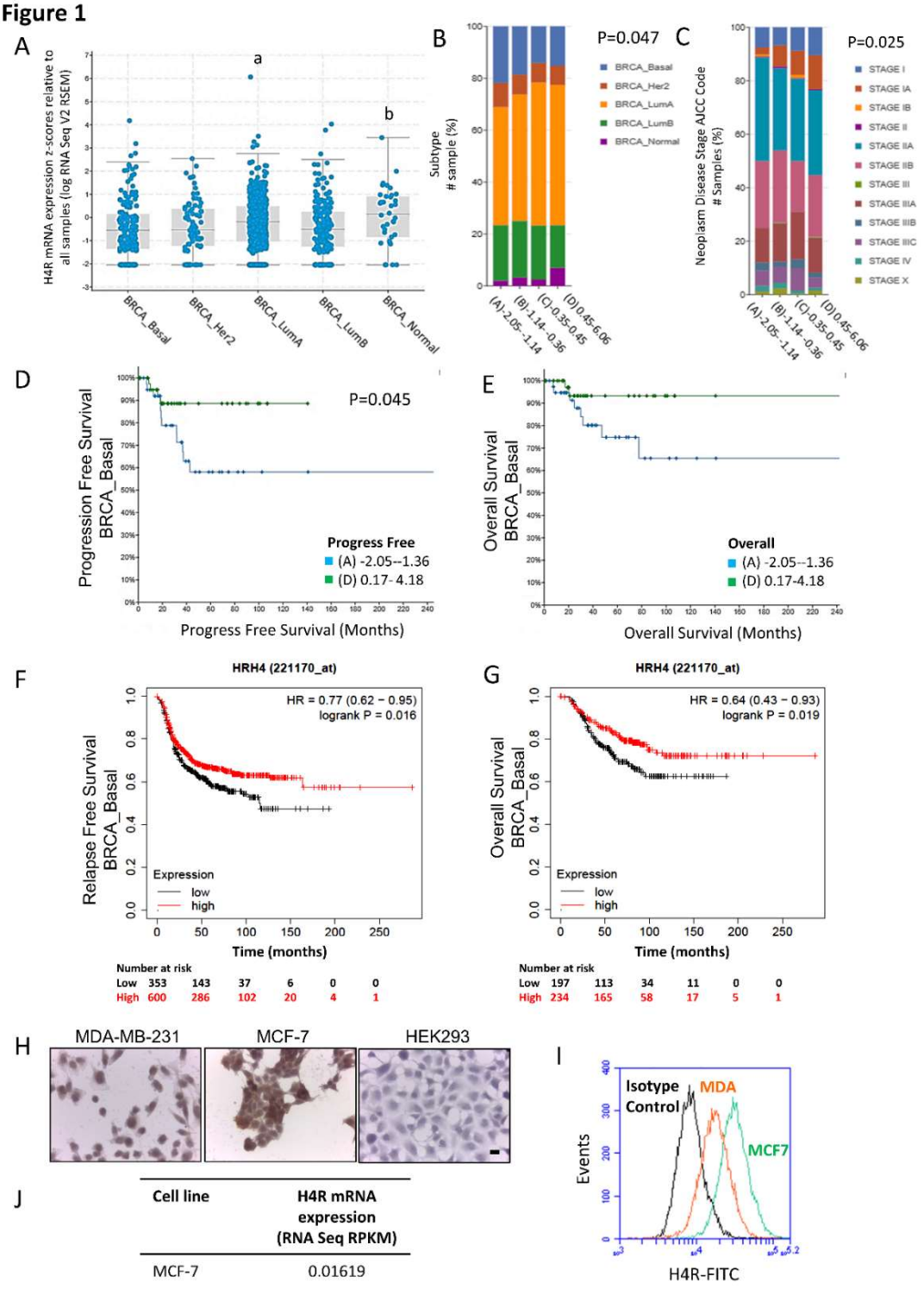
(1) Expresión del H_4R en muestras de cáncer de mama humano.

Los análisis de los datos de TCGA Pan-Cancer Atlas, muestran que la expresión del ARNm de H_4R fue menor en los tumores más agresivos de tipo basal en comparación con los luminales A, que presentan una respuesta clínica más favorable ($p = 0,028$) (Fig. 1A). También se encontró que el cuartil más alto de expresión de H_4R tiene una mayor proporción de tumores luminales A y tumores mamarios tipo normales y una menor proporción de tumores basales en comparación con el cuartil de expresión de H_4R más bajo (Fig. 1B). Además, se observaron niveles más altos de expresión de ARNm de H_4R en el cáncer de mama de menor grado (Fig. 1C).

Estos resultados sugieren que el H_4R parece estar particularmente alterado en el cáncer de mama de tipo basal. Por lo que, para profundizar su rol en la biología tumoral de este subtipo e ilustrar su potencial valor pronóstico, se evaluaron las tasas de supervivencia basadas en la progresión o en la mortalidad en cáncer de mama de tipo basal estratificado según la alta o baja expresión del H_4R. Los niveles más altos de expresión del ARNm se asociaron significativamente con una mejor supervivencia libre de progresión y un aumento no significativo en la supervivencia global (SG) en el cáncer de mama de tipo basal (Fig. 1D y E). Los hallazgos se confirmaron utilizando la base de datos del programa KM plotter, que permitieron graficar curvas de Kaplan-Meier para evaluar supervivencia de pacientes con cáncer de mama de tipo basal (set de datos 221170_x_at para H_4R). Los resultados mostraron que un mayor nivel de expresión del H_4R se asocia significativamente con una mejor supervivencia libre de recaída [cociente de riesgo (HR) 0,77, $p = 0,016$, Fig. 1F] y SG (HR 0,64, $p = 0,019$, Fig. 1G) de los pacientes.

Por otro lado, para validar los datos transcriptómicos, evaluamos la expresión de la proteína del H_4R en una cohorte de pacientes con CMTN. Detectamos la expresión del H_4R en células humanas MCF-7 y MDA-MB-231 mediante inmunocitoquímica (Figura 1H), y en línea con los resultados obtenidos de la expresión de H_4R en los datos de pacientes del TCGA, las células de cáncer de mama de tipo luminal MCF-7 expresan niveles más altos de H_4R en comparación con las células de CMTN MDA-MB-231. Esta mayor expresión de H4R en células MCF-7 se confirmó mediante un análisis de citometría de flujo semicuantitativo (Fig. 1I) y, además, se investigó la expresión del ARNm de H_4R en Cbioportal (Fig. 1J).

Figure 1



H

I

J

Cell line	H4R mRNA expression (RNA Seq RPKM)
MCF-7	0.01619
MDA-MB-231	0.00562

Figura 1. Análisis bioinformáticos de la expresión del H_4R en cáncer de mama. (A) Expresión del ARNm de H_4R en diferentes subtipos de cáncer de mama (BRCA). (B) Porcentaje de muestras con diferentes subtipos de cáncer de mama según los cuartiles de expresión de H_4R. (C) Porcentaje de muestras con diferentes estadios de la enfermedad neoplásica AJCC basado en los cuartiles de expresión de H_4R. (D) Supervivencia libre de progresión y (E) sobrevida global se evaluaron para los cuartiles de expresión más bajos y más altos de H_4R. (F) Supervivencia libre de recaídas y (G) Sobrevida global. Línea roja: pacientes con niveles de expresión superiores a la mediana; Línea negra: pacientes con niveles de expresión por debajo de la mediana. (H – J) Expresión del H_4R en líneas celulares de cáncer de mama humano. (H) Detección inmunocitoquímica de H_4R en MDA-MB-231 y células de cáncer de mama MCF-7. Aumento original de 400×. Barra de escala = 20 μm. (I) La inmunofluorescencia de H_4R se evaluó mediante citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos. (J) Expresión de ARNm de H_4R (RNA Seq RPKM) obtenida en cBioPortal. Abreviaturas: H_4R, receptor H4 de histamina; TCGA, Atlas del genoma del cáncer; SG, supervivencia general; NS, no significativo.

(2) Expresión del H_4R en CMTN y en tejido mamario histológicamente normal adyacente y su asociación con características clínico-patológicas.

A continuación, examinamos la relación entre la expresión proteica del H_4R y su asociación con las características de la clinicopatológicas de la enfermedad. En este estudio se analizaron treinta muestras de pacientes con CMTN. Las características de los pacientes se resumen en la Tabla 1. La inmunomarcación del H_4R muestra un patrón de expresión granular en membrana y citoplasma de las muestras de CMTN, las cuales exhibieron diferentes niveles de expresión (Fig. 2A). 21 de los 30 tumores (70%) mostraron una inmunomarcación positiva para el H_4R con un *score* que oscilaba entre 5 y 180, mientras que 9 tumores mostraron expresión negativa (Fig. 2A a C). Además, se analizó la expresión de H_4R en el tejido normal peritumoral definido como el tejido histológicamente normal adyacente al tumor. En este caso, se observó una inmunomarcación positiva del H_4R en 22 de las 26 muestras (85%), mostrando un *score* de entre 5 y 270 (Fig. 2B y C). Interesantemente, se encontró una correlación positiva moderada entre la expresión del H_4R en el tejido tumoral y peritumoral (Fig. 2C y D). Los estudios de supervivencia mostraron que los pacientes con H_4R positivo tienen una mayor SG en comparación con las muestras que no expresan el receptor H_4R, lo cual fue significativo considerando la expresión en el tejido peritumoral (Fig. 2E y F).

Figure 2

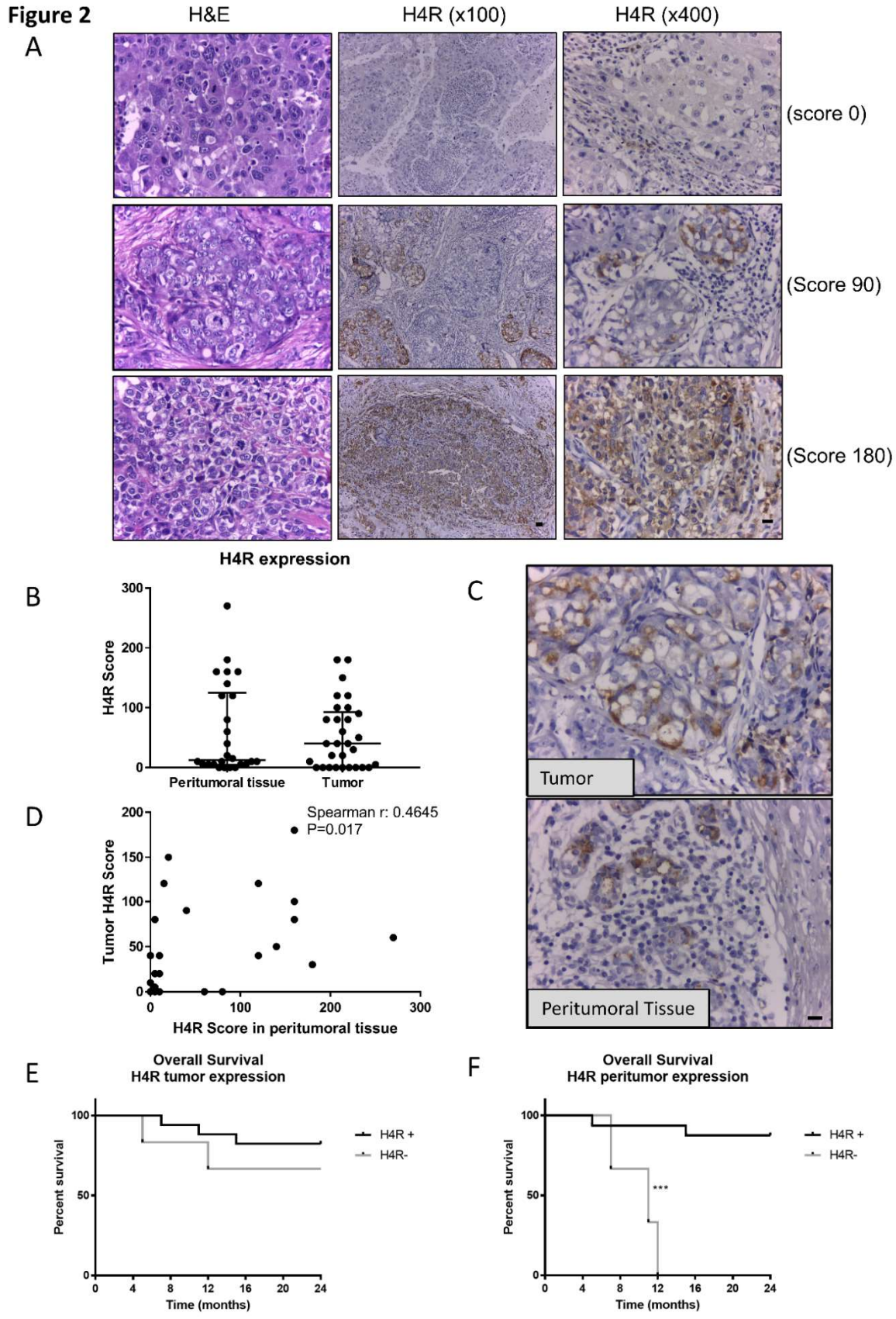

A
H&E
H4R (x100)
H4R (x400)
(score 0)
(Score 90)
(Score 180)
B
H4R expression
H4R Score
300
200
100
0
Peritumoral tissue
Tumor
C
Tumor
Peritumoral Tissue
D
Spearman r: 0.4645
P=0.017
Tumor H4R Score
200
150
100
50
0
0
100
200
300
H4R Score in peritumoral tissue
E
Overall Survival
H4R tumor expression
Percent survival
100
50
0
0
4
8
12
16
20
24
Time (months)
H4R +
H4R-
F
Overall Survival
H4R peritumor expression
Percent survival
100
50
0
0
4
8
12
16
20
24
Time (months)
***
H4R +
H4R-

Figura 2. Expresión de H_4R en tejido tumoral y peritumoral de pacientes con TNBC. (A) Muestras representativas de pacientes con CMTN teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) e inmunomarcación con H_4R. (B) *Score* de tinción del H_4R en tumor y tejido mamario peritumoral (C) Fotografías representativas. Aumento original de 400×. (D) Correlación positiva de Spearman entre la expresión de H_4R en tejido tumoral y el peritumoral. (E, F) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier según la expresión de H_4R (seguimiento: 24 meses).

CONCLUSIONES

El análisis transcriptómico del H_4R de bases de datos públicas junto con los estudios inmunohistoquímicos sugieren que el H_4R podría representar un potencial factor pronóstico asociado con la agresividad y la supervivencia de pacientes con CMTN, que podría complementar el análisis histopatológico de rutina.

Además, la detección del H_4R en muestras de CMTN podría resultar clínicamente relevante considerando que éste representa un potencial blanco terapéutico para este tipo de cáncer de mama agresivo y difícil de tratar. En este sentido, este estudio sirve como punto de partida para continuar con estudios adicionales que ayuden a comprender la importancia del H_4R en la biología y el pronóstico del cáncer de mama en grandes cohortes de pacientes.

RESUMEN

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es el subtipo de cáncer de mama más agresivo, carece de biomarcadores pronósticos y de blancos moleculares. El receptor histaminérgico H4 (H_4R) muestra una expresión funcional en modelos experimentales de CMTN, cumpliendo un rol fundamental en el desarrollo y la progresión tumoral. En este estudio, se comparó la expresión del H_4R en subtipos de cáncer de mama y se correlacionó con características clínicas utilizando datos del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, Atlas Pan-Cáncer). Además, se evaluó la expresión del H_4R mediante inmunohistoquímica en 30 muestras de pacientes de CMTN en relación con los parámetros clínico-patológicos. Los resultados indican que el H_4R está regulado negativamente en tumores de tipo basal/CMTN en comparación con tumores de mama del tipo luminal A y del tipo normales. La mayor expresión de H_4R se asoció con mejores resultados de supervivencia global y libre de progresión en pacientes de tipo basal/CMTN. El H_4R se detectó en aproximadamente el 70% de los tumores y su expresión se correlacionó positivamente con los correspondientes niveles en el tejido peritumoral histológicamente normal. Una elevada expresión de H_4R en el tejido peritumoral se correlacionó con un menor número de ganglios linfáticos afectados y con CMTN unifocal, mientras que se asoció con una mayor supervivencia del paciente. En conclusión, el H_4R podría representar un potencial biomarcador pronóstico en CMTN.

REFERENCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 Cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021;71:209–49. doi:10.3322/caac.21660.
2. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, et al. Breast cancer statistics 2019. CA Cancer J Clin. 2019;69:438–51.
3. Phillips L, Gill AJ, Baxter RC. Novel prognostic markers in triple-negative breast cancer discovered by MALDIMass Spectrometry Imaging. Front Oncol. 2019;9:379.
4. Palleschi M, Maltoni R, Sarti S, et al. Immunotherapy: the end of the "dark age" for metastatic triple-negative breast cancer? Breast J. 2020;26:739–42.
5. Medina VA, Rivera ES. Histamine receptors and cancer pharmacology. Br J Pharmacol. 2010;161:755–67.
6. Martinel Lamas DJ, Croci M, Carabajal E, et al. Therapeutic potential of histamine H4 receptor agonists in triple-negative human breast cancer experimental model. Br J Pharmacol. 2013;170:188–99.
7. Nicoud MB, Sterle HA, Massari NA, et al. Study of the antitumour effects and the modulation of immune response by histamine in breast cancer. Br J Cancer. 2020;122:348–60.
8. Sterle HA, Nicoud MB, Massari NA, et al. Immunomodulatory role of histamine H4 receptor in breast cancer. Br J Cancer. 2019;120:128–38.
9. Massari NA, Nicoud MB, Medina VA. Histamine receptors and cancer pharmacology: an update. Br J Pharmacol. 2020;177:516–38.
10. Nicoud MB, Formoso K, Medina VA. Pathophysiological role of histamine H4 receptor in cancer: therapeutic implications. Front Pharmacol. 2019;10:556.
11. Győrffy B. Survival analysis across the entire transcriptome identifies biomarkers with the highest prognostic power in breast cancer. Comput Struct Biotechnol J. 2021;19:4101–9.
12. Medina V, Cricco G, Nuñez M, et al. histamine-mediated signaling processes in human malignant mammary cells. Cancer Biol Ther. 2006;5:1462–71.
13. Rakha EA, Allison KH, Ellis IO, et al. Vincent Salomon A. Invasive breast carcinoma: general overview. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board, editors. WHO classification of tumours, breast tumours. 5th ed. Lyon: IARC Press; 2019, p. 82–100.
14. Union for international cancer control (UICC). Breast tumours. In: Brierley, J, Gospodarowicz, MK, Wittekind, Ch, editors. TNM Classification of malignant tumours. 8th ed. Oxford: Wiley & Sons; 2017, p. 151–7.
15. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Arch Pathol Lab Med. 2010;134:907–22. doi:10.5858/134.6.907.

SUMMARY

Triple-negative breast cancer (TNBC) is an aggressive breast cancer subtype. There are neither universally accepted prognostic markers nor molecular targets related to TNBC. The histamine H_4 receptor (H_4R) has been characterized in TNBC experimental models, demonstrating its critical role in tumor development and progression. In this study, H_4R expression was compared in breast cancer subtypes and correlated with clinical features using The Cancer Genome Atlas data (Pan-Cancer Atlas). The H_4R status was further evaluated by immunohistochemistry in 30 TNBC human samples in relation to clinicopathological parameters. Results indicate that H_4R was downregulated in basal-like/TNBC compared with luminal A and normal breast-like tumors. The higher expression of H_4R was associated with improved progression free and overall survival outcomes in basal-like/TNBC. H_4R immunoreactivity was detected in about 70% of tumors, and its expression was positively correlated with the levels in the histologically normal peritumoral tissue. High H4R expression in peritumoral tissue correlated with reduced number of lymph node involvement and unifocal TNBC, while it was associated with increased patient survival. In conclusion, the H_4R might represent a potential prognostic biomarker in TNBC.

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS Y PATOLOGÍAS NEUROPSIQUIÁTRICAS EN SALIVA HUMANA

Melisa Carolina Monteleone

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas. IIB - UNSAM - CONICET

Teniendo en cuenta que los desórdenes afectivos como la ansiedad y la depresión afectan miles de personas en el mundo y que aún así no existen diagnósticos moleculares que puedan acompañar la evaluación por parte del profesional, este proyecto buscó encontrar marcadores de estrés y patologías asociadas de manera sencilla y no invasiva en saliva humana.

Para esto, en conjunto con el director del Centro Asistencial Universitario CAU-UNSAM Dr. Luciano Viale y la Dra. Natalia Catoira realizamos un esfuerzo en conjunto para poder recolectar muestras de pacientes y voluntarios que fueran a su consulta. Así entre 2017-2020 se recolectaron muestras de saliva de 95 pacientes (64 mujeres y 29 hombres). Las muestras se centrifugaron para descartar *debris* y bacteria, se alicuotaron en tubos eppendorf con volumen final de 50 µl y se conservaron a -20ºC hasta su uso.

Una alícuota de saliva de cada uno de los pacientes se descongeló en hielo y se utilizó para determinar los niveles de M6a con el kit comercial de ELISA (MyBiosource MBS 2891180). La lectura de las placas de ELISA se realizó con el equipo FilterMax F5 (Molecular Devices). Encontramos diferencias en los niveles de M6a entre el grupo control y depresivos (one tailed; t test p=0.05) y una correlación significativa entre el resultado en el test de estrés percibido (PSS) y los niveles de M6a (Spearman r2: 0.7729; p=0.02) (Figura 1).

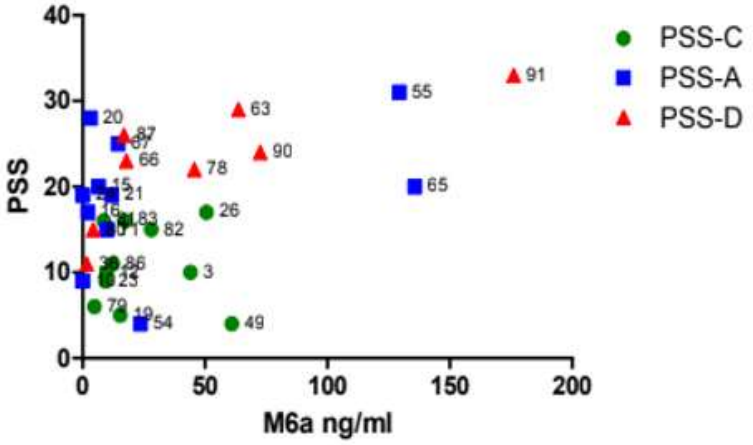


Figura 1. Correlación entre M6a y el PSS entre los grupos de pacientes. Solo encontramos correlación positiva entre M6a y el PSS en el grupo de mujeres diagnosticadas con depresión (p=0.02; triángulos rojos).
PSS-C: control.
PSS-A: ansiosos.
PSS-D: depresivos.

En forma interesante, M6a correlacionó positivamente con el marcador ya validado alfa amilasa, sugiriendo que M6a podría ser un nuevo marcador de estrés (datos no mostrados, ver informe “1”).

A continuación, profesionales expertos en el tema clasificaron a los individuos en ansiosos (A), depresivos (D) y controles (C) usando las escalas clásicas HADS-A, HADS-D, PSS y Beck. El estudio se complejizó dado que la mayoría de los individuos clasificados como ansiosos o depresivos estaban tomando medicación, lo cual podría modificar los niveles de M6a. Por ello, estos grupos fueron subdivididos a su vez de acuerdo a la medicación recibida: inhibidores de la recaptación de la serotonina (SRI) o benzodiacepinas (B).

Nuestros resultados indicaron que los niveles de M6a en saliva varían con el tratamiento y, con más cantidad de muestras y estudios longitudinales, M6a podría ser un indicador de la evolución del paciente con el tratamiento. Esto le daría una herramienta muy valiosa al médico clínico par a poder ajustar la medicación rápidamente. Estos cambios fueron sólo observados en pacientes diagnosticados con depresión, pero no así para los ansiosos (Figura 2).

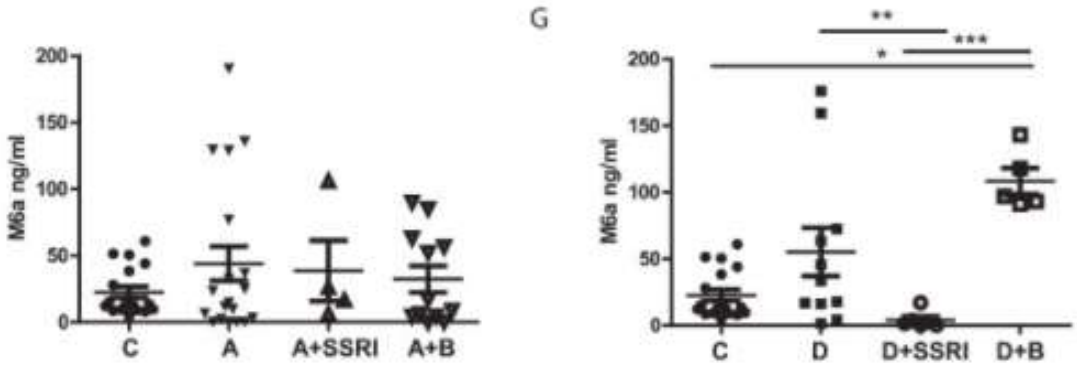
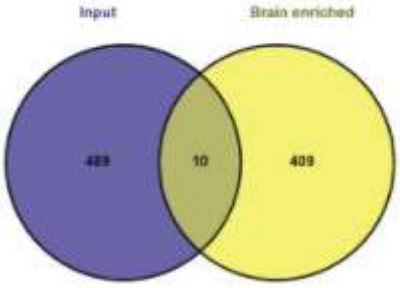


Figura 2. Niveles de M6a determinados por ELISA para pacientes diagnosticados clínicamente con ansiedad (A) y depresión (D), diagnosticados con depresión y tratados con SSRI (D+SSRI), diagnosticados con depresión y tratados con benzodiacepinas (D+B) y sujetos control (C). Los niveles de M6a se alteran significativamente y en patrones opuestos tras el tratamiento con SSRI o B sólo en pacientes depresivos. (ANOVA no paramétrico p = 0.0002. Test de Dunn para comparanciones múltiples ∗ C vs D + B; ∗ D vs D + SSRI; ∗ ∗ ∗ D + SSRI vs D + B). * <0.0001.

Habiendo encontrado estos resultados y considerando la compleja etiología de los desórdenes emocionales, decidimos buscar qué otras moléculas podrían acompañar a M6a y así generar un panel de biomarcadores que de mayor robustez a la detección. Así, purificamos vesículas extracelulares de saliva y realizamos un estudio del conjunto completo de proteínas presentes (proteoma). Decidimos evaluar las vesículas extracelulares (VEs) dado que pueden aislarse de fluidos periféricos, reflejan el estado (fisiológico o patológico) de su célula/tejido de origen y son consideradas reservorios de biomarcadores.

Sorprendentemente, encontramos al menos 10 proteínas de expresión abundante en sistema nervioso central que pueden detectarse en saliva: Factor de transcripción de oligodendrocitos 2 (OLIG2), proteína de mielina periférica 2 (PMP2), glicoproteína neuronal M6A (GPM6A), Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclica 2',3' (CNP), proteína quinasa alpha II dependiente de calcio/calmodulina (CAMK2A), transportador de

glutamato 25A22 (SLC25A22), leucemia mieloide/linfoide traslocado a 11 (MLLT11), receptor 2A de hidroxitriptamina (HTR2A), proteína asociada a los microtúbulos tau (MAPT) y ATPasa 2 de membrana trasportadora de calcio (ATP2B2).



Brain enriched	
GPM6A	HTR2A
CAMK2A	ATP2B2
OLIG2	PMP2
CNP	SLC25A22
MAPT	MLLT11

Disease	pValue	Bonferroni
Muscle Rigidity	6.50E-06	2.94E-03
Psychotic Disorders	1.54E-05	6.99E-03
Abnormal behavior	3.20E-05	1.45E-02
Delusions	5.77E-05	2.62E-02
Mild cognitive disorder	8.60E-05	3.89E-02
Unipolar Depression	8.87E-05	4.02E-02

Figura 3. El input total de proteínas encontradas en la proteómica (círculo violeta) fue contrastado con las proteínas de expresión enriquecidas en cerebro (Human Brain Atlas Database). Allí encontramos 10 moléculas que serán de gran interés para estudios a futuro. La tabla inferior señala el rol de los 10 candidatos hallados en varias enfermedades.

Por lo mencionado anteriormente nuestro trabajo aporta:

- Las vesículas extracelulares de saliva, fluido de fácil acceso, son portadoras de moléculas con expresión enriquecida en cerebro. Así, serían una vía de información directa de lo que está ocurriendo en el sistema nervioso central.
- Dentro de los candidatos encontrados destacamos a la glicoproteína de membrana neuronal M6a, ampliamente estudiada por nuestro grupo como molécula que responde al estrés
- La M6a que puede medirse en saliva correlaciona con la escala de estrés percibido (PSS), pudiendo ser así una medida bioquímica que acompañe la evaluación médica
- La M6a salival es modulada por antidepresivos de la familia SRI y también por benzodiacepinas. Si bien este estudio tiene la desventaja de contar con un *n* reducido de pacientes, nuestros resultados son alentadores como para continuar estudiando a M6a tanto como marcadora de estrés y patologías asociadas como para monitorear la respuesta al tratamiento que recibe cada paciente.

Dificultades encontradas en la Investigación:

El principal problema que enfrentamos es que dado el aumento en el precio de los insumos no hemos podido, hasta el momento, comprar los kits de ELISA para otros de los candidatos identificados en la proteómica ni los kits para el aislamiento e inmunocaptura de los exosomas que permitiría evaluar el contenido de las vesículas de cada uno de los grupos de pacientes (deprimidos, ansiosos y control).

A esto se le sumó la restricción en las actividades por la pandemia de COVID-19 dificultando (aún) nuestro avance en la investigación. Pese a esto, hemos publicado un artículo en la revista "Journal of Affective Disorders Reports" donde presentamos parte de estos resultados (https://doi.org/10.1016/j.jadr.2020.100003).

Funding.

This study was supported by ANPCyT Grants #PICT 2016-01710 and PICT 2017-1736. MCM was awarded with an early career research grant from **AJ Roemmers Foundation.** The funding sources had no role in study design, acquisition, and interpretation of data or writing of the report.

RESUMEN

Según reportes recientes de la Organización Mundial de la Salud, entre 1990 y 2013, el número de personas que sufren depresión y/o ansiedad aumentó casi un 50%. Esto implica que cerca del 10% de la población mundial está afectada. En Argentina en particular, la prevalencia es de 4,7% para la depresión y de 6,3% para los trastornos de ansiedad. Esto indica la relevancia del presente plan de trabajo para nuestro país y la necesidad de mejorar los sistemas de identificación y tratamiento temprano del estrés.

De lo anterior, surge la necesidad de validar marcadores (moléculas o modificaciones en ciertas moléculas) de estrés. Uno de los principales impedimentos para esto es que los efectos principales del estrés se estudian en áreas de difícil o nulo acceso, como lo es el sistema nervioso central. Por esto, nuestro trabajo se focalizará en la **búsqueda de marcadores periféricos de estrés**. Los marcadores tendrían el **valor predictivo** como para ser implementados en nuevas herramientas de detección del estrés o para complementar las ya existentes, permitirían **evaluar el riesgo individual a desarrollar una patología** y también **monitorear el progreso de la enfermedad con el tratamiento correspondiente** (1).

En nuestro laboratorio, usando un modelo de estrés crónico en ratones, encontramos cambios en los niveles séricos de la glicoproteína de membrana M6a. Esta molécula es codificada por el gen *gpm6a*, cuya expresión en hipocampo es afectada por estrés psicosocial. De manera interesante, sus niveles se restauran tras el tratamiento con antidepresivos (2). Resultados recientes señalan que los efectos del estrés sobre la expresión de M6a, pueden ser detectados en suero. Más aún, demostramos que M6a se transporta en vesículas extracelulares. Las mismas son liberadas por las células tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y reflejan los cambios de su tejido/célula de origen (3). Se encuentran en prácticamente todos los fluidos corporales estudiados (suero, sangre, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo). Esto señala a las vesículas como transportadoras de biomarcadores y a M6a como un posible candidato a ser estudiado en el contexto del estrés. Además, las proteínas que se co-transporten junto a M6a en las vesículas podrían tener un rol similar, ampliando el espectro de candidatos a evaluar.

Nuestro grupo se focaliza en el estudio del gen *gpm6a*, que codifica para la glicoproteína de membrana neuronal M6a. La misma está involucrada en la formación de neuritas y en la movilidad de filopodios, facilitando la formación de nuevos contactos sinápticos (4, 5).

Por otro lado, en estudios realizados por nuestro grupo en modelos de estrés crónico en roedores adultos, se encontró que el estrés altera los niveles de expresión de *gpm6a* (entre otros genes) y que estos efectos son revertidos tras el tratamiento de los animales con drogas antidepresivas (6). Evaluamos además la posibilidad de detectar los efectos del estrés sobre los niveles de la glicoproteína neuronal M6a en fluidos extracelulares. Como primera aproximación, determinamos la expresión de M6a en líquido cefalorraquídeo (LCR). Sin embrago, como la toma de muestra es dolorosa e invasiva, decidimos evaluar la expresión y efectos del estrés sobre los niveles séricos de M6a. Utilizando un modelo de estrés crónico en ratones C57Bl/6J adultos, obtuvimos suero y descubrimos que no solamente M6a podía detectase allí, sino que sus niveles eran modificados por el estrés. Dado que M6a es una glicoproteína de membrana neuronal con cuatro pasos transmembrana (similar a una tetraspanina), no se espera su transporte libre en suero. Teniendo esto en cuenta y reportes que remarcan la presencia de tetraspaninas en microvesículas (7), evaluamos si M6a podría estar acoplada a microvesículas. De este trabajo se desprenden dos conclusiones: 1) M6a puede ser detectada en suero y sus niveles son afectados por el estrés y 2) M6a circula en suero acoplada a vesículas extracelulares (Monteleone 2017).

Dado que en humanos la obtención de muestras de saliva es más sencilla y menos invasiva que la toma de muestras de suero, nuestro siguiente objetivo fue evaluar M6a en saliva. Diversos estudios señalan que la composición de la saliva puede reflejar el estado fisiológico de un individuo (8–11). Más aún, el estudio de vesículas en saliva simplificaría la búsqueda y validación de nuevos marcadores ya que actuarían como reservorios de estas moléculas protegiéndolos de la degradación por proteasas extracelulares (12). Teniendo como punto de partida y principal molécula candidata a M6a, lo novedoso de nuestra propuesta es que permitirá no sólo estudiar si las moléculas ya descriptas se encuentran en vesículas sino también que se focalizará en la detección nuevos candidatos.

Con este fin y considerando que la saliva es una fuente abundante de vesículas (13), en este proyecto propusimos explorar potenciales biomarcadores de estrés en saliva.

Los individuos que asistieron al Centro Asistencial Universitario (CAU) fueron clasificados por el Dr. Luciano Viale, director médico de la Institución, en no sintomáticos (controles), ansiosos y deprimidos. Para ello, se les solicitó a todos los participantes que completen el Cuestionario de Depresión de Beck II (BDI-II) (14), el test de ansiedad de Hamilton (15) y la Escala de Estrés Percibido (PSS) (16, 17). De cada individuo se colectaron muestras de saliva y se determinaron los niveles de M6a (Kit comercial de ELISA, MyBiosource #**MBS**9325454) como molécula candidata. Los resultados obtenidos se correlacionaron con el diagnóstico clínico. Por otro lado, se derivaron a un servicio de secuenciación muestras de EVs de saliva para determinar su contenido completo de proteínas (proteoma) para así encontrar otras moléculas de sistema nervioso que acompañen a M6a.

Encontramos no sólo que M6a puede ser detectada en saliva humana sino que sus niveles correlacionan con los resultados en la escala de estrés percibido (PSS) en mujeres depresivas, representando así un parámetro bioquímico de esta escala. Además los niveles de M6a en pacientes depresivos variaron con el tratamiento con antidepresivos del tipo SRI. Esto le daría una herramienta muy valiosa al médico clínico par a poder ajustar la medicación rápidamente.

Las otras moléculas candidatas identificadas en este proyecto, podrán ser utilizadas en el **diseño de paneles de biomarcadores de estrés**. Teniendo en cuenta que no existe un único marcador sensible y específico para el estrés, la combinación de los marcadores con los mayores valores de sensibilidad y especificidad proporcionará información más certera que la que puede suministrar el estudio de un sólo factor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stober G, et al. (2009) Schizophrenia: from the brain to peripheral markers. A consensus paper of the WFSBP task force on biological markers. *world J Biol psychiatry* 10(2):127–55.
2. Alfonso J, et al. (2004) Identification of genes regulated by chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 19(3):659–666.
3. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE (2008) Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics* 8(19):4083–4099.
4. Alfonso J, Fernández ME, Cooper B, Flugge G, Frasch AC (2005) The stress-regulated protein M6a is a key modulator for neurite outgrowth and filopodium/spine formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(47):17196–201.
5. Brocco M, Fernández M, Frasch A (2010) Filopodial protrusions induced by glycoprotein M6a exhibit high motility and aids synapse formation. *Eur J Neurosci* 31(2):195–202.
6. Alfonso J, et al. (2006) Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. *Biol Psychiatry* 59(3):244–51.
7. Andreu Z, Yáñez-Mó M (2014) Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Front Immunol* 5(September):1–12.
8. Streckfus C, et al. (2000) The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: A preliminary study. *Clin Cancer Res* 6(6):2363–2370.
9. Zhang L, et al. (2010) Salivary Transcriptomic Biomarkers for Detection of Resectable Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 138(3):949–957.
10. Hu S, et al. (2011) Identification of autoantibody biomarkers for primary Sjögren's syndrome using protein microarrays. *Proteomics* 11(8):1499–1507.
11. Lee YH, Kim JH, Zhou H, Kim BW, Wong DT (2012) Salivary transcriptomic biomarkers for detection of ovarian cancer: for serous papillary adenocarcinoma. *J Mol Med* 90(4):427–434.
12. Boukouris S, Mathivanan S (2015) Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics - Clin Appl* 9(3–4):358–367.
13. Ogawa Y, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, Yanoshita R (2008) Exosome-Like Vesicles with Dipeptidyl Peptidase IV in Human Saliva. *Biol Pharm Bull* 31(June):1059–1062.
14. Beck A, Ward C, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J (1961) Inventory for Measuring Depression. *Arch Gen Psychiatry* 4:561–571.

15. Hamilton M (1959) The assessment of anxiety status by rating. *Br J Med Psychol* 32(1):50–55.

16. Cohen S, Kamarck T, Mermerlstein R (1983) A Global Measure of Perceived Stress. *J Health Soc Behav* 24(4):385–396.

17. Remor E (2006) Psychometric properties of a European Spanish version of the Perceived Stress Scale (PSS). *Span J Psychol* 9(1):86–93.

ABSTRACT

Mental disorders affect millions of people worldwide; however there are no biochemical tests for their diagnosis. This is in part due to their complex etiology and the fact that the main effects occur in the brain, a non-accessible area. Therefore, efforts are directed to find brain biomarkers in peripheral fluids such as serum or saliva. Here, we searched for them in salivary extracellular vesicles (EVs). EVs are nanosized particles that carry molecules, are liberated in both physiological and pathological conditions and can be isolated from almost every fluid.

This work focused on the protein M6a, related to neuronal connectivity and associated with several mood disorders and M6a levels were measured by ELISA in saliva samples of 88 individuals classified as control, depressed or anxious. Salivary M6a levels positively correlated with the scores for the perceived stress scale in individuals diagnosed with depression. Furthermore, saliva samples of depressed patients treated with serotonin reuptake inhibitors (SSRI) or benzodiazepines differed in their M6a levels with respect to untreated patients. The main limitation of this study lies in the low number of patients involved, which warrants replication.

Since we do not believe that a single protein can represent all the complexity of emotional disorders we searched for other brain circulating proteins aiming to design a biopanel. We identified ten proteins with enriched expression in the brain in the saliva samples: OLIG2, PMP2, CNP, CAMK2A, SLC25A22, MLLT11, HTR2A, MAPT, ATP2B2 and M6a, all associated with emotional disorders. Therefore, the main finding of this work is that salivary EVs contain promising biomarker candidates for mental disorders. Further studies will help validate them for their potential use in diagnosis. Our results lead us to propose M6a as a workable molecule to take into account as a possible stress biomarker.

PREVALENCIA DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA RESPIRATORIA: CHLAMYDIA SPP, EN NIÑOS INTERNADOS EN EL HOSPITAL INFANTIL MUNICIPAL DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA

Jessica Paola Mosmann, Cecilia Gabriela Cuffini,
Ana Ximena Kiguen, Raúl Fernando Venezuela

Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". Facultad de Ciencias Médicas.
Universidad Nacional de Córdoba

INTRODUCCIÓN

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) altas representan la mayor causa de morbi-mortalidad en el mundo, mientras que las IRA bajas de origen viral y bacteriana lo son para niños pequeños, ancianos, pacientes con enfermedades crónicas e inmunocomprometidos (Carballal, et al 2015).

En nuestro país, en el año 2018, se tomaron 74949 muestras respiratorias, de las cuales, solo el 35,3% resultaron positivas para los microorganismos respiratorios bajo vigilancia (Virus respiratorio Sincitial, Influenza A y B, parainfluenza, adenovirus y metapneumovirus), es decir que el 64.7 % de los pacientes estudiados quedaron sin un diagnóstico etiológico (Boletín MSal, 2019).

Desde la pandemia de Influenza A H1N1 2009 ha crecido el interés en muchos países de la región de las Américas en promover y fortalecer estrategias de vigilancia epidemiológica dirigidas al monitoreo permanente de las IRAs asociado a la producción de información estratégica que permita implementar medidas de prevención y control oportunas. En Argentina, desde el año 2003 se implementa el Programa de Infecciones respiratorias agudas bajas en población pediátrica (Resolución Ministerial 1613/2006) en el cual se trabaja en la organización del sistema de salud para dar respuesta frente al aumento de la demanda estacional por infecciones respiratorias. Sin embargo, según la guía de vigilancia IRA 2023 del Ministerio de Salud, entre las infecciones respiratorias bacterianas, recomienda únicamente la detección de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, que causan enfermedades no invasivas como sinusitis, otitis media aguda y neumonía aguda de la comunidad, aunque también puede manifestarse con enfermedades invasivas (Guía de Vigilancia IRA- MSal, 2023).

Existen otros microorganismos de gran importancia en los cuadros respiratorios de niños, como son las Chlamydias y *Micoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), pero en nuestro país no se lleva a cabo el diagnóstico molecular de estas bacterias de manera rutinaria; esto se debe a dos factores: en primer lugar, son las denominadas "bacterias nuevas" por lo que su búsqueda está subestimada, y por otra parte, los métodos de detección requieren de equipamientos y reactivos que no suelen estar al alcance de todas las instituciones (Daloglu, 2023).

Las clamidias son bacterias intracelulares estrictas y son susceptibles a antibióticos. En el orden Chlamydiales se encuentra la familia Chlamydiaceae que comprende el género

Chlamydia (C.) con nueve especies, *C. trachomatis, C. pneumoniae, C. psittaci, C. suis, C. muridarum, C. abortus, C. felis, C. caviae y C. pecorum* (Kuo, et al 2011). Las primeras tres especies chlamydiales son reconocidos agentes patógenos asociados a la producción de diferentes cuadros de neumonías. Las vías de transmisión son diferentes para las tres especies; la primera es por vía vertical; la segunda es horizontal y la tercera es una zoonosis. Las infecciones clamidiales no suelen provocar síntomas, lo que aumenta el riesgo de transmisión a partir de los infectados asintomáticos, y a menudo son sub diagnosticadas o tratadas con antibióticos inespecíficos por lo que constituyen un agente causal de cuadros severos en personas de riesgo, como adultos mayores, niños, inmunocomprometidos y personas gestantes (Frutos, et al 2014). *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* son importantes patógenos humanos que afectan a personas de todas las edades en todo el mundo.

C. trachomatis es una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) más comunes, y la prevalencia de la infección es particularmente alta entre los jóvenes y adolescentes. La infección prepuberal de *C. trachomatis* puede ser una advertencia signo de probable abuso sexual infantil. Además de su papel en las enfermedades genitales, el tracoma es una de las principales causas prevenibles de ceguera en el mundo. *C. trachomatis* también puede causar linfogranuloma venéreo (LGV), una enfermedad sistémica de transmisión sexual caracterizada por ulceración genital y linfadenopatía inguinal. De todas las especies chlamydiales mencionadas, *C. trachomatis* es la única que infecta sólo a los seres humanos y produce la ITS de causa bacteriana más frecuente en el mundo. Algunos estudios sugieren que el riesgo de infección de un recién nacido de madre infectada con *C. trachomatis* es aproximadamente del 70% y puede ocasionar bronquitis, neumonía y conjuntivitis neonatal (Kakar, et al 2010).

C. pneumoniae es responsable de las infecciones de las vías respiratorias, pero la mayoría de las investigaciones recientes sobre *C. pneumoniae* se han centrado en las infecciones persistentes asociadas con enfermedades crónicas y se ha considerado una infección infantil con posibles consecuencias en la edad adulta (Daloglu, 2023).

Por otro lado, *C. psittaci* es una causa de zoonosis, y las aves son los reservorios. En Argentina, la notificación de un caso de psitacosis es obligatoria; sin embargo, sólo unos pocos informes de diagnóstico serológico han sido publicados (Frutos, et al 2016; Espinosa, et al 1996, Fernández, et al 1999, Frutos, et al 2012). Nuestro grupo reportó 21% de prevalencia de *C. psittaci* en Córdoba en pacientes con sospecha de esta infección (Cadario, et al 2017).

Los macrólidos y quinolonas son considerados las mejores opciones de tratamiento empírico para las neumonías causadas por Chlamydias, ya que tienen buena actividad antimicrobiana y alcanzan altas concentraciones intracelulares (Nenoff, et al 2017, Webley, et al 2017, Cillóniz, et al 2017).

Debido a que, como bien se ha comentado anteriormente, el diagnóstico de las Chlamydias no está incluido en los paneles de infecciones respiratorias de rutina, es que consideramos de suma importancia conocer acerca de esta infección en niños internados con sintomatología respiratoria y conocer la situación epidemiológica de la región y las cepas bacterianas circulantes poco estudiadas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de Chlamydia spp. en niños internados en el Hospital Infantil municipal de la Ciudad de Córdoba, con el fin de aportar datos fidedignos acerca de la circulación y formas de presentación de estas bacterias de importancia respiratoria en nuestro medio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia de Chlamydia spp. en muestras respiratorias de pacientes internados en el Hospital Infantil Municipal de la ciudad de Córdoba.
- Analizar la presencia de Chlamydia spp. en las distintas semanas epidemiológicas con el fin de establecer un patrón de circulación del microorganismo mencionado.
- Relacionar la presencia de Chlamydia spp. con los datos demográficos de los pacientes con el fin de determinar asociaciones significativas.
- Establecer asociaciones entre la presencia de Chlamydia spp. y la clínica de los pacientes con el objetivo de aportar datos fidedignos de la presentación de estos microorganismos en niños de nuestro medio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio: Se incluyeron todos los pacientes que fueron hospitalizados por IRA en el Hospital Infantil Municipal de Córdoba, por un periodo de 12 meses. Los padres o tutores fueron invitados a participar, firmando consentimiento y asentimiento informado correspondiente.

Criterios de Inclusión: Pacientes de hasta 15 años de edad, con diagnóstico presuntivo de resfrío, bronquiolitis, síndrome obstructivo bronquial y neumonía.

Criterios de Exclusión: Pacientes que tuvieron condiciones locales o generales que impidieron la obtención de las muestras clínicas.

Metodología: A todos los pacientes incluidos se les extrajo muestra de Aspirado Nasofaríngeo (ANF) o Hisopado Faríngeo (HF) para el diagnóstico etiológico. Se registraron datos epidemiológicos, demográficos y clínicos. Las muestras recolectadas fueron refrigeradas a 4°C, adecuadamente alicuotadas y enviadas dentro de las 24-48 horas al Instituto de Virología, donde fueron procesadas.

Extracción de ADN: Se utilizó el método de extracción de proteinasa K de un equipo comercial Bioneer Accu Prep con las indicaciones de su fabricante.

PCR Chlamydia spp: Se estableció la técnica de PCR genérica para la detección de un fragmento de 576 pb de los dominios variables II, III y IV del gen ompA de Chlamydia spp.. El gen ompA de Chlamydias codifica para la proteína mayor de membrana de la bacteria.

Los oligonucleótidos CHOMP 191 (GCI YTI TGG GAR TGY GGI TGY GCI AC) y

CHOMP 371 (TTA GAA ICK GAA TTG IGC RTT IAY GTG IGC IGC) se seleccionaron de acuerdo al protocolo descripto por Sachse and Hotzel, 2003, y la PCR fue puesta a punto en el laboratorio.

Los fragmentos de ADN (5 µl) fueron amplificados en presencia de 0,2 mM de los respectivos oligonucleótidos, de 0,8 mM de dNTPs y 1 unidad de enzima Gotaq polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, Carisbad, CA) en volumen final 50 µl.

Visualización de productos: Los productos de PCR se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa y revelado en un transiluminador UV.

Análisis estadístico: Se realizó un análisis de estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central y dispersión con las variables mensurables y porcentajes con las variables categóricas. Para estudiar las asociaciones presentes entre las variables se realizaron tablas de contingencia y Test de Chi Cuadrado o Fisher según correspondía. Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el programa Epi info (CDC).

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 1068 muestras desde el comienzo del año 2019 y fines de 2020. Todas las muestras obtenidas fueron aspirados nasofaríngeos, de niños internados en el Hospital Infantil Municipal de la Ciudad de Córdoba.

Las características de los pacientes estudiados fueron las siguientes: a todos los pacientes incluidos en el estudio se les extrajo una muestra de aspirado nasofaríngeo para diagnóstico virológico. Se registraron datos epidemiológicos y demográficos (edad, sexo), y por otra parte clínicos (diagnóstico presuntivo, tipo de internación).

Todos los pacientes fueron tratados de acuerdo con las normas de la Institución, independientemente de este estudio. Se recibieron un total de 1068 muestras de pacientes hospitalizados de las cuales se obtuvieron los resultados de la detección de Chlamydia spp para el presente proyecto (además de la detección de los virus respiratorios de rutina realizados por el hospital participante). Todas las muestras obtenidas fueron aspirados nasofaríngeos. Los datos de los pacientes estudiados fueron los siguientes:

Sexo	Femenino	481
	Masculino	587
Internación	Sala	795
	UTI [a]	142
	UCI [b]	94
	Sin datos	37
Diagnóstico clínico	Bronquiolitis	372
	Asma	85
	Neumonía adquirida en la comunidad	78
	Síndrome obstructivo bronquial	354
	Bronquitis obstructiva recurrente	18

	Otras afecciones respiratorias [c]	132
	Sin datos	29

a. Unidad de terapia intensive.

b. Unidad de cuidados intensivos.

c. Incluye: síndrome febril, convulsión, displasia broncopulmonar, EPOC, estenosis, laringitis, infección respiratoria aguda.

De las 1068 muestras, se obtuvieron **86 (8.05%)** de ellas positivas para Chlamydia spp.

Chlamydia spp	Positiva	86
	Negativa	982

De las 86 muestras positivas, 40 corresponden al sexo femenino y 46 masculinos. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia de Chlamydia y el sexo del paciente ($p>0.05$), como así tampoco con la característica de la internación (53 sala, 13 UCI, 16 UTI, 4 sin datos; $p>0.05$).

En referencia a la edad de los niños estudiados, se obtuvieron los siguientes intervalos:

Edad	**Total**	**Positivos**	**(%)**
0 a 5 años	897	73	8.14
6 a 10 años	83	6	7.23
11 a 15 años	41	3	7.31
sin datos	47	4	8.5

Como se observa en los resultados mostrados, el porcentaje de detección de Chlamydia en cada uno de los intervalos de edades, fue similar. Por lo cual, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la edad de los pacientes y la presencia de Chlamydia ($p>0.05$).

El mayor porcentaje de detección de Chlamydia se obtuvo en las semanas epidemiológicas 19 a 27 (del año 2019), correspondientes a los meses de mayo y junio, coincidiendo con la época de comienzo de temperaturas frías y la aparición de varios de los virus respiratorios ya conocidos y detectados en los exámenes de rutina del hospital. Cabe destacar que, si bien la detección del panel respiratorio de rutina no formaba parte de los objetivos del presente proyecto, podemos complementar la información de los resultados, informando que se ha realizado la detección de adenovirus, parainfluenza I, II y III, virus sincicial respiratorio (RSV), metapneumovirus, virus influenza A y B, siendo el más frecuente en estos pacientes el RSV.

DISCUSIÓN

En la temporada de infecciones virales del tracto respiratorio inferior, también es necesario pensar en otras causas de infección, especialmente si el curso clínico y los hallazgos de laboratorio no son típicos de una infección viral (Li, et al 2015).

La neumonía por clamidia parece ingresar al cuerpo humano a través del epitelio de la mucosa respiratoria, y se ha demostrado que, después de infectar las células epiteliales pulmonares y los macrófagos alveolares, pueden infiltrarse en diferentes tipos de células, como monocitos, macrófagos, células dendríticas derivadas de monocitos, linfocitos y neutrófilos (Porritt, et al 2016). Cuando no se erradica la bacteria, los cuerpos reticulares (partícula infectiva de las Chlamydias), interesados en esconderse del sistema inmunitario del huésped dentro de los cuerpos de inclusión, pueden persistir intracelularmente durante largos períodos de tiempo y causar una infección crónica. Los monocitos infectados crónicamente pueden diseminarse por todo el cuerpo a través del tracto respiratorio inferior. (Daloglu, 2023).

Si bien, *C. trachomatis* es conocida como la bacteria de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial, produciendo diferentes afecciones tanto a hombres como mujeres; es de vital importancia la detección de esta bacteria en personas gestantes ya que aumenta el riesgo de parto prematuro y de nacimiento de un niño con bajo peso al nacer, mientras que en recién nacidos puede causar inflamación de la conjuntiva y neumonía (Mishori, et al 2012, Li, et al 2015). La infección se transmite persona gestante a recién nacido durante el paso por el canal del parto, y también se han descrito casos raros de infección durante el parto por cesárea. El riesgo de transmisión vertical de la infección por clamidia al niño es del 60 al 70 % en el parto vaginal y del 8 % en la cesárea (Mishra, et al 2011). Se desarrolla neumonía en el 10 al 20 % de los recién nacidos de personas gestantes con infección por clamidia. La infección respiratoria con la bacteria *C. trachomatis* se demostró en 10 de 148 (7%) lactantes menores de 6 meses con problemas respiratorios (Sivic, et al 2016).

La neumonía aparece en bebés de 1 a 6 meses de edad y se presenta en forma subaguda. La tos puede estar presente tan pronto como tres semanas antes del inicio de la neumonía. Más tarde, puede unirse la respiración rápida. El niño no suele tener temperatura elevada. Hay chasquidos audibles por encima de los pulmones, en ocasiones también sibilancias, por lo que a menudo diagnosticamos erróneamente bronquiolitis. En raras ocasiones, la dificultad respiratoria es tan grave que es necesaria la ventilación artificial (Li, et al 2015, Mishra, et al 2011, Rours, et al 2009).

La mitad de los niños también presentan inflamación de la conjuntiva ocular en su anamnesis o durante el examen clínico. En los bebés prematuros, la neumonía por clamidia se desarrolla de manera diferente que en los niños nacidos a término. Los síntomas pueden aparecer tan pronto como 48 horas después del nacimiento con dificultad respiratoria grave, pausas para respirar y problemas de alimentación. Es difícil distinguir la neumonía por clamidia de la bronquiolitis aguda en un bebé menor de 3 meses, especialmente en invierno, cuando la frecuencia de bronquiolitis es alta. Ambas infecciones van acompañadas de tos y respiración acelerada y crepitantes por encima de los pulmones. A diferencia de la bronquiolitis, la neumonía por clamidia se caracteriza por un inicio gradual de los síntomas y la ausencia de una temperatura corporal elevada. Sin embargo, también se sabe que los bebés con bronquiolitis en este grupo de edad no tienen fiebre con más frecuencia que los niños mayores**. (**Sivic, et al 2016).

Si se demuestra una infección con la bacteria *C. trachomatis* en un niño, es necesario un tratamiento con antibióticos. Ambos padres deben ser derivados para tratamiento en una clínica ambulatoria de enfermedades de transmisión sexual por el riesgo de infección para su tratamiento y, en caso de un nuevo embarazo también, por el riesgo para la salud del hermano del niño (Yu, et al 2009).

Los datos sobre la incidencia de infecciones por clamidia entre mujeres en edad reproductiva en Eslovenia hablan a favor de la introducción de pruebas de detección de infección por *C. trachomatis* en mujeres embarazadas, ya que esto podría prevenir la morbilidad relacionada con esta bacteria tanto en la madre como en el niño. (Mishra, et al 2011, Sivic, et al 2016).

En referencia a *C. pneumoniae,* ésta afecta principalmente a niños en edad escolar, y el tiempo de infección inicial alcanza su punto máximo entre los 5 y los 15 años de edad, razón por la cual también en este estudio recolectamos muestras de niños de 0 a 15 años; sin embargo, con el avance de las investigaciones, esto puede cambiar y hoy sabemos que podemos encontrar dicha infección, en diferentes rangos etarios sin predominancia en alguno en particular, resultado que también fue demostrado en el presente proyecto. Algunos estudios han demostrado que la tasa de prevalencia de la infección en los niños más pequeños puede ser similar a la de los mayores (Dal Molin, et al 2005, Daloglu, 2023).

En humanos *C. pneumoniae* se presenta como un cuadro respiratorio que afecta hasta el 70% de la población en todo el mundo al menos una vez durante su vida (Rodolakis, et al 2010). El contagio humano se produce por el contacto con personas enfermas u asintomáticas, por lo que constituye un patógeno de gran capacidad de dispersión (Cuffini, et al 2006). Aunque aún no está confirmado, nuestro grupo de investigación aporto datos en referencia a su posible rol zoonótico; a partir de un estudio en un centro recreativo de Córdoba (Frutos, et al 2014).

La infección por *C. pneumoniae* es frecuentemente asintomática o se manifiesta con síntomas leves, infecta el epitelio de las vías respiratorias superiores en los niños, puede causar o contribuir a la otitis media aguda y la sinusitis, así como a la tos prolongada y la neumonía adquirida en la comunidad (Daloglu, 2023).

C. pneumoniae parece sensible a tetraciclinas, macrólidos, cetólidos y la mayoría de las fluoroquinolonas (p. ej., levofloxacina y moxifloxacina, pero no ciprofloxacina). Un total de 70 a 90% de los niños con neumonía por C. pneumoniae erradican el organismo de la nasofaringe después de un ciclo de 10 días de eritromicina, claritromicina o un ciclo de 5 días de azitromicina (Block, et al 1995, Harris, et al 1998). Cuando se prescribe tetraciclina o doxiciclina, los regímenes de tratamiento típicos consisten en 14 a 21 días: 14 días para eritromicina, 7 a 14 días para fluoroquinolonas o claritromicina y 5 días para azitromicina. La mejoría clínica ocurre en una alta proporción de niños incluso si no reciben tratamiento o reciben antibióticos betalactámicos que se consideran ineficaces. Por otra parte, a pesar de 10 a 30 días de tratamiento adecuado, en algunos pacientes persiste el aislamiento continuo del organismo (Esposito, et al 2005, Daloglu, 2023).

Finalmente, la tercera de las Chlamydias capaces de producir infecciones respiratorias es *C. psittaci*, la misma puede causar infección sistémica y neumonía, a menudo llamada psitacosis u ornitosis (Bachmann, et al 2014).

La psitacosis es responsable del 1% de los casos incidentes de neumonía adquirida en la comunidad, según un metanálisis reciente (Hogerwerf, et al 2017). De 1990 a 2008, los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) recibió 756 informes de psitacosis, de los cuales el 9% involucraba a personas menores de 20 años (McNabb, et al 2007). No es una enfermedad bien reconocida por los médicos, existen dificultades en el diagnóstico de la infección y puede deberse al subregistro, se piensa que esto puede no estar reflejando el número real de los casos (Daloglu, 2023).

C. psittaci se transmite a través de la inhalación de aerosoles que contienen secreciones del tracto respiratorio, secreciones oculares, orina o heces de aves infectadas. Incluso la exposición limitada a aves infectadas o sus excrementos puede causar enfermedades. La mayoría de los casos notificados de psitacosis se han relacionado con la exposición a aves domésticas. Dado que *C. psittaci* es resistente al secado y puede permanecer infeccioso durante meses en el medio ambiente, es posible que en algunos casos no se notifique la exposición aviar (Beckmann, et al 2009).

La psitacosis clásicamente causa neumonía "atípica". Las presentaciones de la enfermedad pueden variar desde síntomas leves similares a los de la influenza hasta enfermedades sistémicas graves. El período de incubación suele ser de 5 a 14 días, pero los síntomas pueden aparecer hasta un mes después de la exposición. Es imposible hacer un diagnóstico diferencial según las características clínicas en comparación con otros patógenos de la neumonía adquirida en la comunidad. Se debe considerar la psitacosis en cualquier niño con neumonía que haya tenido contacto cercano con aves. La doxiciclina, la eritromicina y la azitromicina son los fármacos recomendados para el tratamiento (Beckmann, et al 2009, (Daloglu, 2023).

En conclusión, se ha mostrado con los resultados de este trabajo, como así también apoyado por datos bibliográficos, que, muchas veces la evaluación clínica por sí sola del paciente con sintomatología respiratoria no es suficiente para llegar a un diagnóstico etiológico, por lo que un diagnóstico de laboratorio rápido y específico tiene un impacto significativo en el manejo de los pacientes y prevención de diseminación de microorganismos, particularmente en pacientes vulnerables como en este caso. Incluso, la detección a tiempo de dichas infecciones poco estudiadas como Chlamydia, reduciría en un 50% el tiempo de internación y hasta un 30% el uso de antibióticos. Sería importante como metas futuras, continuar con el estudio de Chlamydia en infecciones respiratorias y poder dilucidar la especie específica en cada niño infectado, ya que no es menor el porcentaje de Chlamydias detectadas en los pacientes estudiados.

LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

Debido a la situación de público conocimiento (aislamiento social obligatorio a partir del día 20 de marzo de 2020), todas las actividades académicas se vieron afectadas. Por lo tanto, el presente proyecto sufrió un detenimiento en la toma de muestras y análisis de las mismas, ya que esta última actividad se desarrolló en un instituto de investigación, y no en un hospital per se.

Es sabido también que, a pesar de estar este proyecto relacionado a una infección respiratoria, todas las prioridades a partir de marzo 2020 (del hospital del cual obtuvimos las muestras) fueron avocadas a la detección de covid, dificultando la obtención de las muestras para este estudio.

Conforme se fue normalizando gradualmente la situación de la pandemia, pudimos poco a poco retomar las actividades en el laboratorio, como así también la recepción de las muestras para este proyecto por parte del hospital participante.

En relación a lo metodológico y analítico en el laboratorio, no hemos tenido dificultades mayores.

BIBLIOGRAFÍA

- Bachmann NL, Polkinghorne A, Timms P. Chlamydia genomics: Providing novel insights into chlamydial biology. Trends in microbiology. 2014;22(8):464-472.
- Beeckman DSA, Vanrompay D. Zoonotic Chlamydophila psittaci infections from a clinical perspective. Clinical microbiology and infection. 2009;15(1):11-17.
- Block S, Hedrick J Hammerschlag MR, Cassell GH, Craft JC. Mycoplasma pneumoniae and chlamydia pneumoniae in pediatric community- acquired pneumonia: Comparative efficacy and safety of clarithromycin vs. erythromycin ethylsuccinate. The Pediatric infectious disease journal. 1995;14(6):471-47 7.
- Boletín Integrado de Vigilancia. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de Salud. Nro 434 Semana epidemiológica 1. 2019; 17-33.
- Cadario ME, Claudia L, Madariaga J, Frutos MC, Cuffini C. Epidemiological and molecular characteristics of Chlamydia psittaci from eight human cases of psittacosis and four related birds in Argentina. Revista Argentina de Microbiologia. 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.001.
- Carballal, G. y Echavarría, M. Infecciones respiratorias de origen viral: Impacto y diagnóstico etiológico. En Mestre EO, editor. Virología Médica. 4ª ed. CABA: Corpus Libros Médicos y Científicos, 2015; p. 261-272.
- Cillóniz, C, et al. Community-acquired pneumonia related to intracellular pathogens. Intensive care medicine, 2016; 42 (9): 1374-86.
- Cuffini C, Guzmán LA, Villegas N, Alonso CE, Riera LM, Rodríguez Fermepín M. Isolation of Chlamydophila pneumoniae from Atheromas of the Carotid Artery and their antibiotics susceptibility profile. Microbiol. Clín. 2006; 24:81-85.
- Dal Molin G, Longo B, Not T, Poli A, Campello C. A population based seroepidemiological survey of chlamydia pneumoniae infections in schoolchildren. Journal of Clinical Pathology. 2005;58(6):617-620.
- Daloglu, H. (2023). Childhood Chlamydia Infections. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.111712.
- Espinosa M, Deodato B, Cernigoi B, Seijo A. Cross-reactivity between Chlamydia psittaci and Acinetobacter in indirect immunofluorescence assays. Rev Argent Microbiol. 1996; 28(3):143–6.
- Esposito S, Bosis S, Faelli N, Begliatti E, Droghetti R, Tremolati E, et al. Role of atypical bacteria and azithromycin therapy for children with recurrent respiratory tract infections. The Pediatric infectious disease journal. 2005;24(5):438-444.
- Fernández F, Ouviña G. Seroprevalence of Chlamydia psittaci in cats assembled in the Center of Zoonosis of the Municipal of Moron. Rev Argent Microbiol. 1999; 31:1-35.
- Frutos María Celia, Marina Monetti, Ximena Kiguen, Fernando Venezuela, Viviana Ré, Cecilia Cuffini. Genotyping of C. psittaci in central area of Argentina. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2012; 74 320–22.
- Frutos MC, Monetti M, Re VE, Cuffini C. Molecular evidence of Chlamydia

pneumoniae infection in reptiles in Argentina. Rev. Argent Microbiol. 2014; 46(1):45-48.

- Frutos MC., Monetti MS., Mosmann J, Kiguen AX., Venezuela RF., Ré VE., Cuffini CG. Molecular characterization of Chlamydia pneumoniae in animals and humans from Argentina. Genetic characterization of Chlamydia pneumoniae. Infect Genetics and Evol. 2016; 44: 43–45.
- Harris J-AS, Kolokathis A, Campbell M, Cassell GH, Hammerschlag MR. Safety and efficacy of azithromycin in the treatment of community-acquired pneumonia in children. The Pediatric infectious disease journal. 1998;17(10):865-871.
- Hogerwerf L, De Gier B, Baan B, Van Der Hoek W. Chlamydia psittaci (psittacosis) as a cause of community- acquired pneumonia: A systematic review and meta-analysis. Epidemiology & Infection. 2017;145(15):3096-3105.
- Kakar S., Bhalla P., Maria A., Rana M., Chawla R., Mathur NB. Chlamydia trachomatis causing neonatal conjunctivitis in a tertiary care center. Indian J Med Microbiol. 2010; 28: 45-7.
- Kuo C, Stephens R. Family I. Chlamydiacaea. In: Whitman, William B. (Ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Springer Science/Business Media, New York, USA, 2011; 845.
- Li Y, Xiong L, Huang Y, Xia Y, Zhou H, Xu F, et al. The clinical characteristics and genotype distribution of Chlamydia trachomatis infection in infants less than six months of age hospitalized with pneumonia. Infect Genet Evol. 2015; 29: 48–52.
- McNabb S, Jajosky RA, Hall-Baker PA, Adams DA, Sharp P, Anderson WJ, et al. Summary of notifiable diseases---United States, 2005. MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report. 2007;54(53):1-92.
- Mishori R, McClaskey EL, WinklerPrins VJ. Chla- mydia trachomatis infections: screening, diagno- sis, and management. Am Fam Physician. 2012; 86(12): 1127–32.
- Mishra KN, Bhardwaj P, Mishra A, Kaushik A. Acute Chlamydia trachomatis respiratory infection in infants. J Glob Infect Dis. 2011; 3(3): 216–20.
- Nenoff, P. et al. Non-viral sexually transmitted infections-epidemiology, clinical manifestations, diagnostics and therapy: part 2: Chlamydia and mycoplasma. Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete. 2017; 68 (1): 50-58.
- Porritt RA, Crother TR. Chlamydia pneumoniae infection and inflammatory diseases. Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics. 2016;7(3-4):237-254.
- Rodolakis A, Yousef Mohamad K. Zoonotic potential of Chlamydophila. Vet. Microbiol. 2010; 27: 140 (34):382-91.
- Rours GI, Hammerschlag MR, Van Doornum GJ, Hop WC, de Groot R, Willemse HF, Verbrugh HA, Verkooyen RP. Chlamydia trachomatis respiratory infection in Dutch infants. Arch Dis Child. 2009; 94(9): 705–7.
- Sachse K, Hotzel H. Detection and differentiation of chlamydiae by Nested-PCR. Methods Mol. Biol. 2003; 216:123–136.
- Šivic, U., Keše, D., Mrvič, T., & Praprotnik, M. (2016). Pneumonia in an infant caused by Chlamydiae trachomatis. Zdravniški Vestnik, 85(9), 499-504.

- Talkington DF et al. Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection in autopsy and open lung biopsy tissues by nested PCR. J. Clin. Microbiol. 1998; 36:1151-53.
- Webley, WC.; HAHN, David L. Infection-mediated asthma: etiology, mechanisms and treatment options, with focus on Chlamydia pneumoniae and macrolides. Respiratory research. 2017; 18 (1): 98.
- Yu J, Wu S, Li F, Hu L. Vertical transmission of Chlamydia trachomatis in Chongqing China. Curr Microbiol. 2009; 58(4): 315–20.4.

ABSTRACT

High Acute Respiratory Infections (ARI) represent the greatest cause of morbidity and mortality in the world, while low ARI of viral and bacterial origin are for young children, the elderly, patients with chronic diseases and immunocompromised. There are other microorganisms of great importance in the respiratory symptoms of children, such as Chlamydias. *C. trachomatis, C. pneumoniae* and *C. psittaci* are the three-chlamydial species associated with the production of different pneumonia conditions.

The aim of this project was to determine the prevalence of Chlamydia spp. in children admitted to the municipal Children's Hospital of the City of Córdoba, in order to provide reliable data about the circulation of these bacteria of respiratory importance in our environment.

Out of 1068 nasopharyngeal swab samples, 86 (8.05%) of them were positive for Chlamydia spp. (40 female- 46 male). No statistically significant association was found between the presence of Chlamydia and the patient's sex, age and hospitalization characteristics ($p>0.05$). The highest percentage Chlamydia was obtained in the epidemiological weeks 19 to 27 (of the year 2019), corresponding to the months of May and June.

In the season of viral lower respiratory tract infections, it is also necessary to think about other causes of infection. In conclusion, it has been shown with the results of this work, as well as supported by bibliographic data, that often the clinical evaluation by itself of the patient with respiratory symptoms is not enough to reach an etiological diagnosis. Even the timely detection of such little-studied infections such as Chlamydia would reduce hospitalization time by 50% and the use of antibiotics by up to 30%. It would be important as future goals to continue with the study of Chlamydia in respiratory infections and to be able to elucidate the specific species in each infected child.

PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN Y REPARACIÓN DEL DAÑO AL ADN COMO INDICADORES DE RESPUESTA CLÍNICA Y EVOLUCIÓN EN PACIENTES ONCOLÓGICOS TRATADOS CON CISPLATINO

Silvina Beatriz Nadin, Laura María Vargas Roig, Mayra Lis Sottile Fleury, Fernando Darío Cuello Carrión, Jorge Ibarra, Silvana Semino, Lucía González

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo - IMBECU. Centro Científico Tecnológico - CCT - CONICET Mendoza

INTRODUCCIÓN

Las drogas antineoplásicas análogas del platino, como el cisplatino (cPt) y el carboplatino, se utilizan ampliamente en el tratamiento de muchos tipos de tumores, incluidos los cánceres de pulmón, testículo, vejiga, ovario y mama, linfomas y melanomas [1]. El efecto citotóxico de estos fármacos depende de la formación de aductos covalentes en el ADN, que distorsionan su estructura, inhiben la transcripción y la replicación y provocan roturas en la doble hélice. El daño al ADN activa vías de señalización para inducir la muerte celular si la maquinaria de reparación del ADN no logra corregir el daño [2]. Desafortunadamente, algunos pacientes que inicialmente responden al tratamiento pueden desarrollar resistencia [3].

Uno de los desafíos en la investigación del cáncer consiste en identificar marcadores moleculares capaces de predecir la respuesta al tratamiento clínico. Durante muchos años, el ensayo cometa (*comet assay*) o electroforesis en gel de una sola célula se ha utilizado para medir el daño del ADN en células individuales, adquiriendo popularidad como método altamente sensible, simple y de bajo costo que obtiene resultados consistentes y confiables [4]. Esta técnica ha sido reconocida como un método útil para el biomonitoreo del daño en el ADN inducido por una amplia gama de agentes que dañan el ADN en leucocitos de sangre periférica [5]. Varios estudios han demostrado la utilidad del ensayo para evaluar la progresión y el tratamiento de los pacientes con cáncer [6]. Años atrás, nuestro grupo de investigación realizó un estudio piloto que demostró la utilidad del ensayo cometa alcalino para predecir la respuesta a la quimioterapia basada en doxorrubicina o cisplatino en linfocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con cáncer [7].

La inestabilidad genómica se considera una de las características del cáncer [8]. Durante la tumorigénesis, las tasas de mutación aumentan y la alteración de la respuesta al daño del ADN (*DNA Damage Response*, DDR) compromete la integridad genómica y contribuye al crecimiento de las células tumorales [9]. Las rupturas de doble cadena en el ADN constituyen uno de los tipos más de daño en el ADN más severos, porque aumentan la inestabilidad del genoma y promueven transformaciones malignas. Este tipo de daño activa la DDR mediante la cual las quinasas ATM, ATR y ADN-PK fosforilan la variante H2AX de histona en Ser139 (γH2AX). Como resultado, focos γH2AX se propagan alrededor de los sitios dañados en el ADN [10]. Además, γH2AX actúa como un andamio

molecular para otros factores de reparación del ADN, como la proteína 53BP1 (proteína 1 de unión a p53), que recluta proteínas de reparación al sitio dañado. γH2AX y 53BP1 han sido propuestos como biomarcadores de respuesta tumoral y pronóstico [11]. Aún continúa el desafío de encontrar biomoléculas que puedan usarse como marcadores predictivos para evitar la resistencia y mejorar la eficacia de una amplia gama de terapias contra el cáncer.

En las últimas décadas, las Proteínas de Golpe de Calor (*Heat Shock Proteins*, HSP), también conocidas como chaperonas moleculares, son esenciales para mantener la homeostasis celular y se han asociado con proliferación tumoral, la inhibición de la muerte celular, la angiogénesis y la metástasis [12]. La proteína Hsp27 tiene un rol importante en la supervivencia celular principalmente a través de la regulación de la apoptosis [13]. También hay evidencia de que las HSPs están involucradas en los mecanismos de reparación del ADN [14]. Se ha demostrado que Hsp27 se relaciona con la respuesta y pronóstico en muchos tipos de cáncer [15, 16]. La familia Hsp90 (HSPC) tiene cientos de proteínas cliente [17]. Hsp90α es la forma inducible de Hsp90 que contiene dos residuos de treonina (Thr5 y Thr7) que no están presentes en la forma constitutiva de Hsp90β [18]. La DDR puede fosforilar Hsp90α (p-Hsp90α) en Thr 5/7, reclutando a la proteína en los sitios dañados [19, 20]. Además, se ha reportado que p-Hsp90α es esencial para el mantenimiento de focos γH2AX [20].

En este trabajo nos propusimos como objetivo general: Determinar la utilidad de proteínas implicadas en la señalización y reparación del daño al ADN (γH2AX, 53BP1, Hsp27 y fosfo-Hsp90α) como indicadores predictivos y pronósticos en pacientes oncológicos tratados con quimioterapia basada en drogas análogas del platino. Los objetivos específicos del proyecto fueron los siguientes:

1. Determinar en LSP de pacientes oncológicos, obtenidos antes de iniciar la quimioterapia basada en cPt y expuestos in vitro a la droga, el daño en el ADN y la expresión de γH2AX, 53BP1, Hsp27 y p-Hsp90α.
2. Evaluar la expresión de γH2AX, 53BP1, Hsp27 y p-Hsp90α en secciones de tejidos tumorales primarios fijados en parafina procedentes de los pacientes incluidos en el Objetivo 1.
3. Establecer si la expresión γH2AX, 53BP1, Hsp27 y p-Hsp90α en LSP y en tumores se asocia con la respuesta clínica y la evolución de los pacientes oncológicos tratados con quimioterapia basada en cPt.

METODOLOGÍA

Sujetos. Muestras de sangre. Se incorporaron 10 personas sanas (no fumadoras, sin antecedentes familiares de cáncer) 5 hombres y 5 mujeres (edad promedio 32 años) y 53 pacientes oncológicos (Tabla 1). El criterio de selección de los pacientes fue el siguiente: diagnóstico histológico y/o citológico de tumor compatible con el uso de cisplatino, no haber recibido quimioterapia o radioterapia anteriormente, edad <70 años, función hepática y renal normales. Se obtuvieron 10-15 mL de sangre (por punción venosa periférica) de sujetos sanos y de pacientes oncológicos antes de la quimioterapia. Los linfocitos de sangre periférica (LSP) fueron separados mediante gradiente de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, USA) y conservados a -80°C para los tratamientos experimentales.

Tejidos tumorales. Se incorporaron 51 tacos embebidos en parafina de tumores primarios pertenecientes a los pacientes oncológicos que donaron muestras de sangre periférica (Tabla 2). El proyecto fue desarrollado en colaboración con el Dr. Jorge Ibarra, médico oncólogo y director médico del Centro Oncológico de Integración Regional (COIR Mendoza). Los pacientes firmaron un consentimiento informado según la declaración de Helsinki, el cual fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación en Salud (CEIS) del Centro Oncológico de Integración Regional (COIR) con fecha 06/09/2012 y vigente a la fecha. La evolución promedio de los pacientes fue de 21,94 meses (rango 1-40 meses).

Cultivo de LSP y procedimientos experimentales. Los LSP fueron cultivados en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y en presencia de 5 mg/mL de fitohemaglutinina de acuerdo con procedimientos descriptos anteriormente [21]. Los LSP de sujetos sanos y de pacientes oncológicos fueron expuestos a 200 μM de cisplatino (cPt) durante 1 hora; y luego recolectados inmediatamente después del tratamiento con cPt (tiempo 0: T0), y luego de 24 y 48 horas de recuperación a 37°C (tiempo 24 y 48: T24, T48, respectivamente). Una parte de los LSP fueron fijados en 10% buffer formaldehído/PBS para inmunocitoquímica y otra parte criopreservada a -80°C (en 50% SFB/40 % RPMI/10 % DMSO) para alkaline comet assay [7].

Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. En LSP fijados en 10% formol-buffer y en tejidos incluidos en parafina se analizaron las expresiones proteicas de Hsp27, γH2AX, 53BP1 y p-Hsp90α utilizando los siguientes anticuerpos primarios específicos: anti-γH2AX rabbit polyclonal (Ser139, Cell Signaling), anti-53BP1 rabbit polyclonal (Cell Signaling), anti-Hsp27 mouse monoclonal antibody (ADI-SPA-800 Enzo Life Sciences) y anti-p-HSP90α rabbit polyclonal antibody (Thr5/7, Cell Signaling). Las células fueron permeabilizadas en 0,5% Tritón X100/PBS 1X. La recuperación antigénica se realizó en ebullición con Buffer citrato 0,01M pH 6,0. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios y seguidamente con el anticuerpo secundario y el reactivo ABC (Vectastain, Vector, USA). La inmunotinción se realizó con 0,5 mg/mL de diaminobencidina/0,01% de peróxido de hidrógeno como sustrato cromógeno y la contratinción con 0,5% verde de metilo. Los preparados se evaluaron con un microscopio Nikon Eclipse E200 (Japan) con objetivo de 100X. En cada ensayo se incluyó un control negativo (sin incorporación de anticuerpo primario) [21]. Los preparados de tejidos fueron evaluados en intensidad y proporción con un microscopio Carl Zeiss Axio Scope, a doble ciego junto a la Dra. Silvana Semino, médica anatomopatóloga del Hospital Universitario [22].

Alkaline comet assay. La metodología se llevó a cabo según el procedimiento descripto anteriormente por nuestro grupo de trabajo [23]. La migración del ADN es directamente proporcional al daño. Como control positivo de daño al ADN, un grupo de células fue tratado durante 1 hora con 60 μM H_2O_2. Los controles negativos consistieron en muestras no tratadas con las drogas. Dado que cPt origina aductos y compactación en el ADN, se utilizó como segundo agente H_2O_2 para generar fragmentación en el ADN [7].

Respuesta clínica. La respuesta a la quimioterapia se evaluó de acuerdo con los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST 1.1) de la siguiente manera: respuesta completa (RC; desaparición de todas las lesiones), respuesta parcial (RP; al menos una disminución del 30% en la suma de los diámetros de lesiones originales), enfermedad progresiva (EP; al menos un aumento del 20 % en la suma de los diámetros

de las lesiones) o enfermedad estable (EE; sin reducción suficiente para calificar como RP ni aumento suficiente para calificar como EP) [24].

Evolución. Después del tratamiento sistémico, los pacientes fueron evaluados periódicamente mediante evaluación clínica y estudios de imágenes. El seguimiento promedio de los pacientes (desde marzo de 2016 hasta marzo de 2020) fue de 21,94 meses (rango, 1-40 meses). La SLE (Supervivencia Libre de Enfermedad) se calculó como el tiempo hasta la progresión después de la quimioterapia de primera línea. La SG (Supervivencia Global) se calculó como el período desde el diagnóstico hasta la fecha de la muerte.

Análisis estadístico. Las comparaciones entre tratamientos experimentales de sujetos sanos y pacientes oncológicos se efectuaron mediante la prueba de Kruskal Wallis (Post test de Dunn) y Mann Whitney. Mediante Fisher´s exact test se determinó correlación con la respuesta clínica de los pacientes. Se realizaron curvas de Kaplan Meier para establecer relaciones con la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes. Para los cálculos estadísticos se utilizó el programa GraphPad PRISM (versión 5.0, San Diego, CA, USA). Se consideraron estadísticamente significativos valores de $P<0,05$.

Tabla 1. Características de los pacientes incluidos en el estudio de LSP.

Characteristic	Number (%)
Age (years)	
Mean (range)	56 (26-81)
Sex	
Female	25 (47.2)
Male	28 (52.8)
Cancer stage at diagnosis	
I	4 (7.5)
II	17 (32)
III	14 (26.4)
IV	16 (30.2)
NE	2 (3.8)
Tumor type	
Cervix	13 (24.5)
Testis	5 (9.4)
Lung	9 (17)
Digestive tract	9 (17)
Bladder	7 (13.2)
Larynx	2 (3.8)
Others	8 (15.1)
Therapy	
Cisplatin-based therapy	51 (96.2)
Carboplatin-based therapy	2 (3.8)

Tabla 2. Características de los pacientes incluidos en el estudio de tejidos tumorales primarios.

Age (years)	
Mean (range)	56.92 (15-81)
Sex	**Number of cases (%)**
Male	30 (58.8)
Female	21 (41.2)
Stage at diagnosis	
I	8 (15.7)
II	7 (13.7)
III	23 (45.1)
IV	12 (23.5)
NE	1 (2.0)
Type of tumor	
Ovarian cancer	11 (21.6)
Testicular cancer	9 (17.6)
Lung cancer	8 (15.7)
Digestive-tract cancers	7 (13.7)
Bladder cancer	6 (11.8)
Endometrial cancer	4 (7.8)
Other	6 (11.8)
Chemotherapy	
Cisplatin-based	30 (58.8)
Carboplatin-based	21 (41.2)
Follow-up (months)	
Mean (range)	19.2 (1-40)

NE: Not Evaluable.

RESULTADOS

3.1. Resultados en linfocitos de sangre periférica.

3.1.1. Daño en el ADN y la expresión de γH2AX, 53BP1 y p-Hsp90α en condiciones basales. Diferencias entre sujetos sanos y pacientes oncológicos.

El daño basal en el ADN y porcentaje de LSP con daño total (score 5) en condiciones basales determinados mediante *comet assay*, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sujetos sanos y muestras pre-quimioterapia de pacientes oncológicos (Figura 1). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre

individuos sanos y pacientes con cáncer en la expresión basal de otros marcadores: γH2AX (Figura 2), 53BP1 (Figura 3) y p-Hsp90α citoplasmática (C), nuclear (N) y cociente N/C (Figura 4).

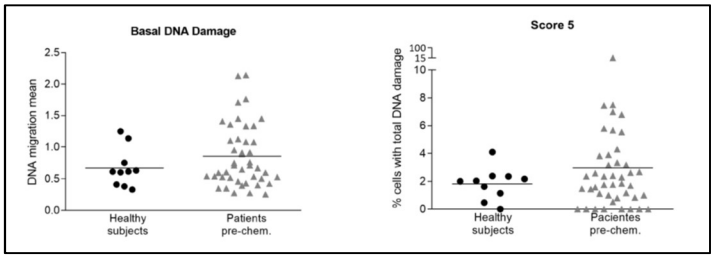


Figura 1. Daño basal en el ADN y porcentaje de células con daño total en LSP: diferencias entre sujetos sanos y pacientes oncológicos.

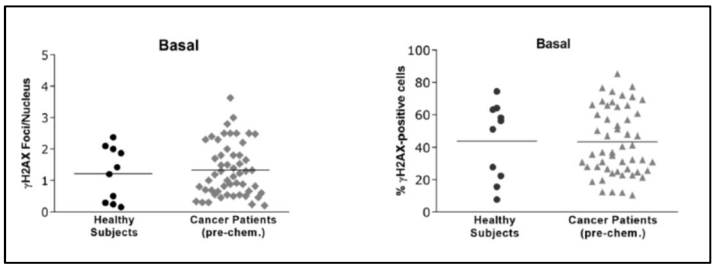


Figura 2. Expresión de γH2AX evaluada como focos/núcleo y porcentaje de LSP con inmunotinción positiva. Diferencias entre sujetos sanos y pacientes oncológicos.

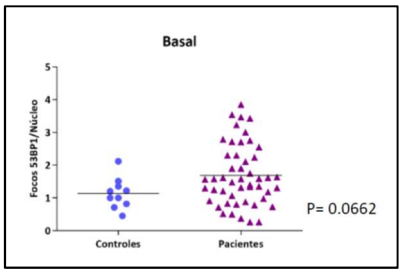


Figura 3. Focos por núcleo de 53BP1 en LSP. Diferencias entre sujetos sanos y pacientes oncológicos.

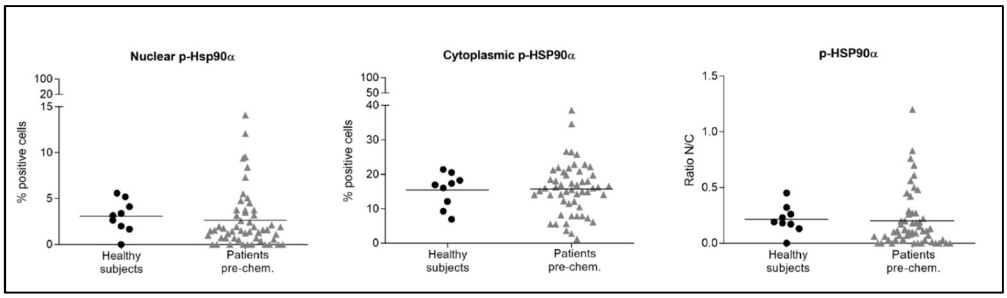


Figura 4. p-Hsp90α citoplasmática (C), nuclear (N) y cociente N/C en LSP. Diferencias entre sujetos sanos y pacientes oncológicos.

3.1.2. Daño en el ADN y expresión de γH2AX, 53BP1 y p-Hsp90α en LSP expuestos in vitro a cPt. Diferencias entre condiciones experimentales.

LSP de sujetos sanos y de pacientes oncológicos (pre-quimioterapia) fueron expuestos in vitro cPt. El daño al ADN y la expresión de γH2AX, 53BP1 y p-Hsp90α fueron evaluados inmediatamente después del tratamiento con cPt (cPt0, tiempo 0) y luego de recuperación en medio de cultivo fresco durante 24 y 48 h (cPt24 y cPt48, respectivamente). En pacientes con cáncer, el daño inducido por cPt resultó estadísticamente significativo (media de migración del ADN y porcentaje de células con daño total o score 5) a tiempos 0, 24 y 48, respecto del grupo control (Figura 5). Llamativamente, en LSP de personas sanas se observó un incremento en el porcentaje de células con daño total (score 5) a las 48 h del tratamiento con cPt ($P<0,05$), Figura 5.

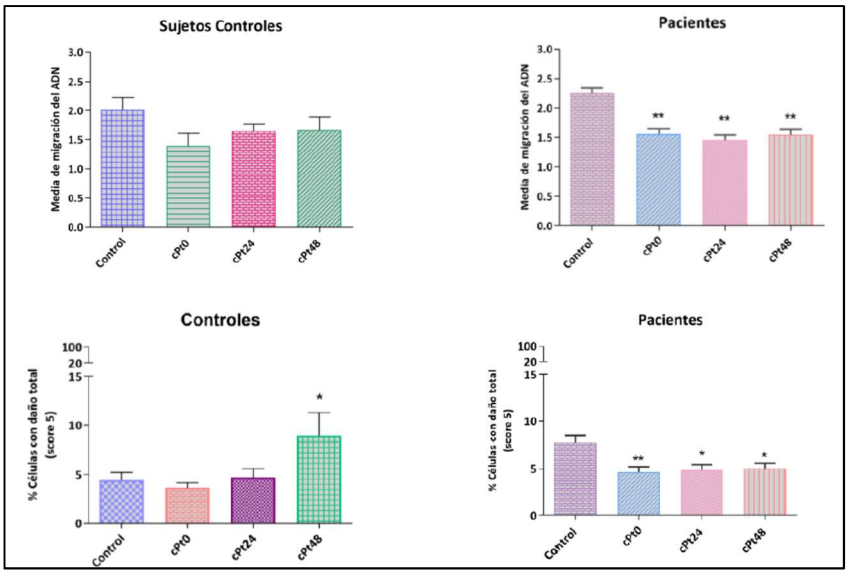


Figura 5. Media de migración del ADN y % de LSP con daño total (score 5) en sujetos sanos y pacientes oncológicos. Diferencias entre condiciones experimentales (cPt0, cPt24 y cPt48).

El número de focos de γH2AX/núcleo en LSP de sujetos controles aumentó significativamente a las 24 h del tratamiento con cPt (P<0,05), mientras que en pacientes oncológicos este incremento se mantuvo en el tiempo hasta las 48 h del tratamiento (Figura 6). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de 53BP1 en individuos sanos y en pacientes (datos no mostrados).

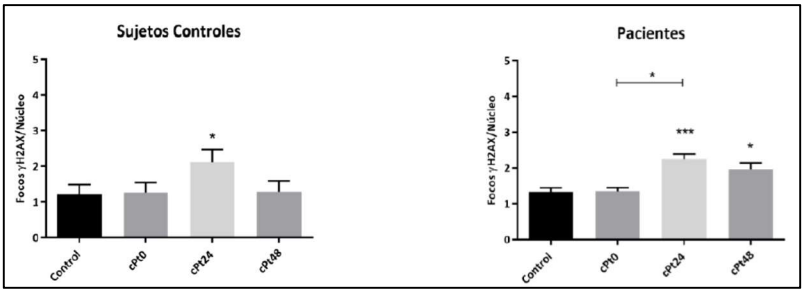


Figura 6. Focos de γH2AX/núcleo en LSP de sujetos controles sanos y pacientes con cáncer tratados in vitro con cPt a las 0, 24 y 48 h (cPt0, cPt24 y cPt48, respectivamente).

La expresión de p-Hsp90α (cociente N/C) se incrementó a las 24 y 48 h del tratamiento con cPt, resultando estadísticamente significativa en pacientes con cáncer (Figura 7).

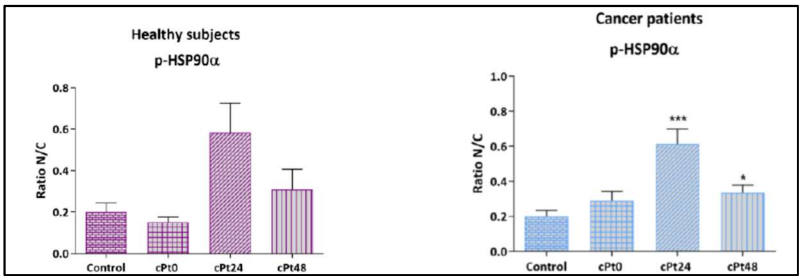


Figura 7. Cociente N/C de p-Hsp90α en LSP de sujetos controles sanos y pacientes con cáncer tratados in vitro con cPt a las 0, 24 y 48 h (cPt0, cPt24 y cPt48, respectivamente).

3.1.3. Daño en el ADN y expresión de γH2AX, 53BP1 y p-Hsp90α en LSP expuestos in vitro a cPt. Relación con la respuesta clínica al tratamiento y evolución de los pacientes.

El % de células con daño total inmediatamente después del tratamiento con cPt (cPt0) fue mayor en pacientes respondedores a la quimioterapia (RC o RP), que en pacientes no

respondedores (EE o EP). Este mismo comportamiento también se verificó en cuanto a la expresión del cociente N/C de p-Hsp90α a las 48 h del cPt (cPt48), Figura 8.

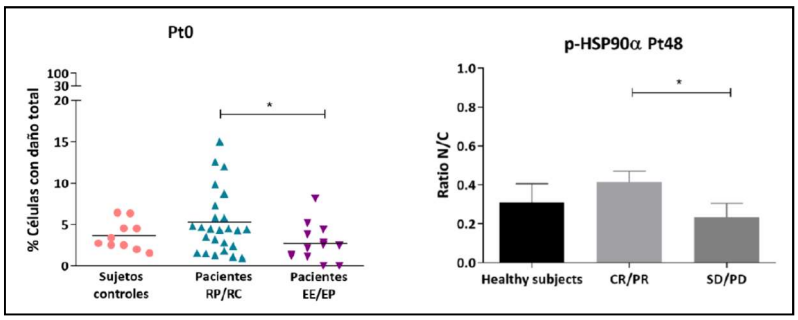


Figura 8. Porcentaje de células con daño total y cociente N/C de p-Hsp90α en LSP de pacientes con cáncer tratados in vitro con cPt en función de la respuesta clínica.

Los pacientes oncológicos que presentaron mayor media de migración en el ADN a las 24 h del tratamiento con cPt (cPt24) en LSP pre-quimioterapia, presentaron mejor supervivencia libre de enfermedad (P<0,05). A las 48 h del tratamiento con cPt, una media de migración del ADN en LSP, correlacionó también con mejor supervivencia libre de enfermedad y global (P<0,05), Figura 9.

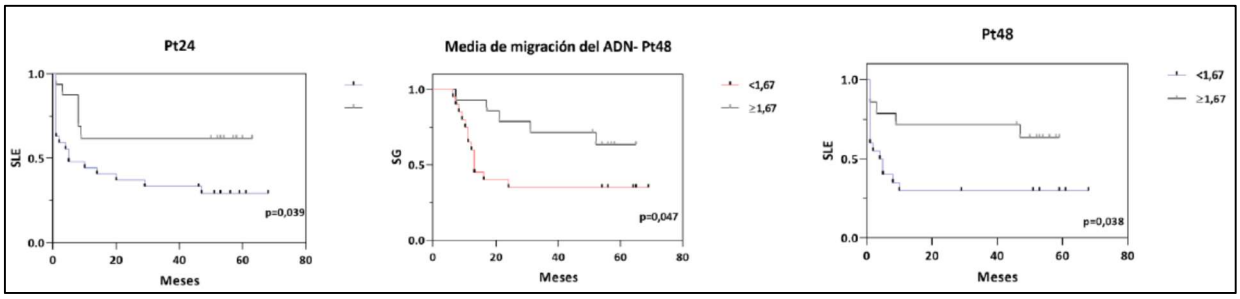


Figura 9. Curvas de supervivencia en función de la media de migración del ADN en LSP pacientes con cáncer tratados in vitro con cPt. SLE: supervivencia libre de enfermedad. SG: supervivencia global. cPt24: LSP recolectados a las 24 h del tratamiento con cPt. cPt48: LSP recolectados a las 48 h del tratamiento con cPt.

También observamos que mayor daño total (score 5) en LSP de pacientes oncológicos inmediatamente después del tratamiento in vitro con cPt (cPt0), presentaron mejor supervivencia libre de enfermedad y global (P<0,05), Figura 10.

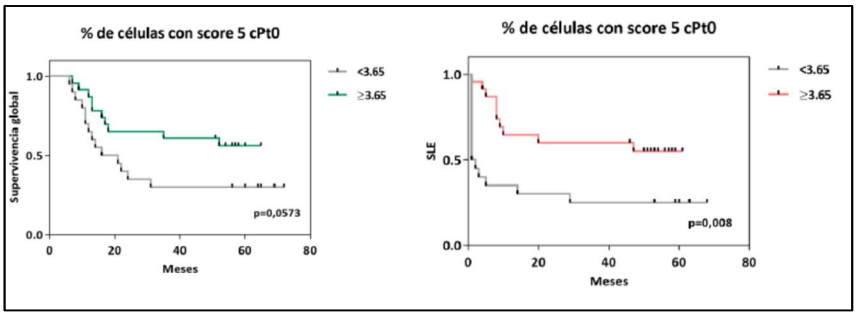


Figura 10. Curvas de supervivencia en función del % de LSP con daño total (score 5). SLE: supervivencia libre de enfermedad. cPt0: LSP recolectados inmediatamente después del tratamiento con cPt.

Los resultados de la sección 3.1. en LSP fueron comunicados en las siguientes reuniones científicas:

"Valor pronóstico del daño al ADN en leucocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer expuestos in vitro a cisplatino"/Prognostic value of DNA damage in peripheral blood leukocytes from cancer patients exposed to cisplatin in vitro". Sottile, Mayra L. - Redondo, Analía L. - Gómez, Laura C. - García, María B. - González, Lucía. - Ibarra, Jorge. - Vargas Roig, Laura M. - Nadin, Silvina B. Congreso Interuniversitario I+D+i. Mendoza, Argentina. 24 al 26 de noviembre de 2021. E-Poster 836.

"*Phosphoryated HSP90-alpha expression in peripheral blood leukocytes from cisplatin-treated cancer patients*". Mayra L. Sottile, Laura C. Gómez, Analía L. Redondo, María B. García, Lucía González, Jorge Ibarra, Laura M. Vargas Roig, Silvina B. Nadin. Reunión de Sociedades de Biociencias 2020. LXV REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA (SAIC). Buenos Aires, Argentina. Resumen #301 (464). Revista Medicina Vol. 80, Suplemento V, 2020, pág. 134.

Publicación de los resultados en revista Internacional con referato en proceso.

3.2. Resultados obtenidos a partir de tejidos tumorales primarios.

3.2.1. Expresión de γH2AX, 53BP1, Hsp27 y p-Hsp90α en tumores y tejidos normales adyacentes.

Se analizó la expresión de γH2AX, 53BP1, Hsp27 y p-Hsp90α en tumores y tejido normal adyacente (51 casos; Figura 11). La expresión de γH2AX fue significativamente mayor en los tejidos tumorales que en los tejidos normales adyacentes ($P< 0,0001$; Tabla 3). Se observó expresión de Hsp27 y p-Hsp90α en el núcleo y citoplasma de células malignas y normales. La expresión nuclear de estas HSPs se observó con mayor frecuencia en tumores que en tejidos normales adyacentes. Además, los tejidos tumorales mostraron una mayor expresión citoplásmica de p-Hsp90α que los tejidos normales (Tabla 3). También se estudiaron las proteínas de reparación del ADN, MLH1, MSH2 y ERCC1, relacionadas con resistencia a cPt, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 11).

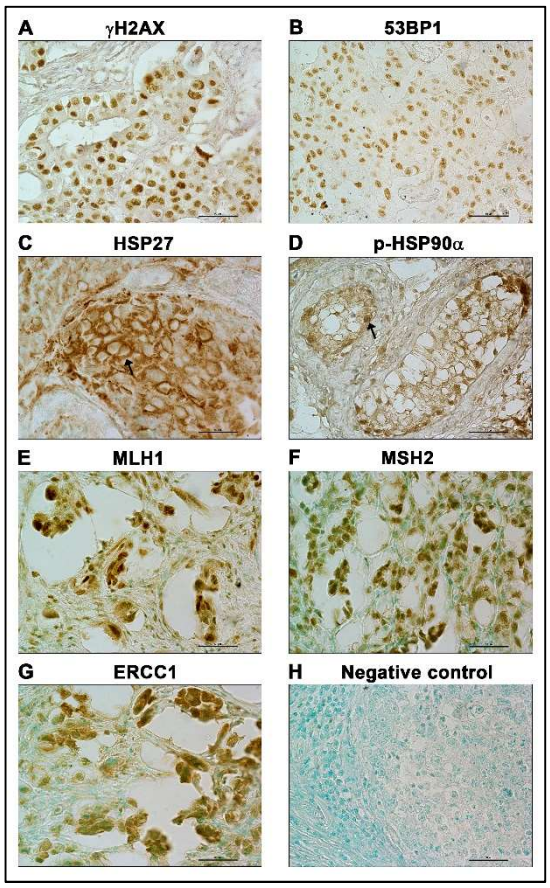


Figura 11. Imágenes representativas de inmunotinciones para γH2AX, 53BP1, Hsp27, p-Hsp90α, MLH1, MSH2 y ERCC1 en tejidos tumorales de pacientes oncológicos. Tinción para γH2AX (A) y 53BP1 (B) en carcinomas de pulmón. Inmunotinciones para Hsp27 (C) y p-Hsp90α (D) en carcinoma urotelial y seminoma, respectivamente. La fleche Negra en (C) señala tinción citoplasmática para Hsp27, incluso en fibroblastos y células endoteliales. Nótese en (D) predominio de tinción nuclear para p-Hsp90α indicado por la flecha. MLH1 (E), MSH2 (F), ERCC1 (G) y control (H) negative en cistoadenocarcinomas de ovario. Magnificación 400x, escala 50 µm.

Biomarker	Tumor tissue N (%)	Adjacent normal tissue N (%)	p value
γH2AX			
- **High expression**	32 (62.7)	6 (11.8)	< 0.0001[a]
- **Low expression**	19 (37.3)	45 (88.2)	
53BP1			
- **High expression**	24 (47.1)	13 (25.5)	ns[a]
- **Low expression**	27 (52.9)	38 (74.5)	
Nuclear HSP27			
- **Presence**	23 (45.1)	7 (13.5)	0.0005[a]
- **Ausence**	28 (54.9)	45 (86.5)	
Cytoplasmic HSP27			
- **P>2 (High)**	21 (41.2)	12 (23.5)	ns[a]
- **P≤2 (Low/ausence)**	30 (58.8)	39 (76.5)	
Nuclear p-HSP90α			
- **Presence**	32 (62.7)	4 (7.8)	< 0.0001[b]
- **Ausence**	19 (37.3)	47 (92.2)	
Cytoplasmic p-HSP90α			
- **P>2 (High)**	39 (76.5)	14 (27.5)	< 0.0001[a]
- **P≤2 (Low/ausence)**	12 (23.5)	37 (72.5)	

P: proportion. ns: not significant. [a]Chi-square test. [b]Fisher's exact test.

Tabla 3. Expresión diferencial de γH2AX, 53BP1, Hsp27 y p-Hsp90α en tejidos tumorales y tejidos normales adyacentes.

3.2.2. Importancia clínica de la expresión tumoral de γH2AX, 53BP1, Hsp27 y p-Hsp90α.

La respuesta clínica a la quimioterapia fue evaluada en 42 de los 51 pacientes, ya que 9 pacientes recibieron quimioterapia adyuvante. La tasa de respuesta completa fue del 30,95% (13/42 pacientes), presentando RP 10 pacientes (23,81%), 5 EE (11,91%) y 14 EP (33,33%). Los pacientes respondedores incluyen pacientes con respuesta clínica completa (RC) y respuesta parcial (RP), mientras que los pacientes no respondedores incluyen los pacientes con enfermedad estable (EE) y enfermedad progresiva (EP). Elevada expresión de γH2AX se asoció significativamente con una peor respuesta clínica a la quimioterapia basada en platino (P= 0,014), Figura 12A. Los pacientes con alta expresión de 53BP1 mostraron una asociación estadísticamente significativa (P=0,014) con mala respuesta clínica (EE y EP), Figura 12B. En el caso de Hsp27, la ausencia de expresión nuclear y la reducida expresión citoplasmática se observó predominantemente en pacientes con RC y RP a quimioterapia (p=0,016 y p=0,034, respectivamente), Figura 12C-D.

Llamativamente, la presencia nuclear de p-Hsp90α resultó estadísticamente significativa en pacientes con RC o RP (p= 0,006). No se observaron diferencias significativas para la respuesta clínica en cuanto a la expresión citoplasmática de p-Hsp90α (Figura 12E-F). No se observaron diferencias significativas entre la expresión de MLH1, MSH2 y ERCC1 y la respuesta clínica (datos no mostrados).

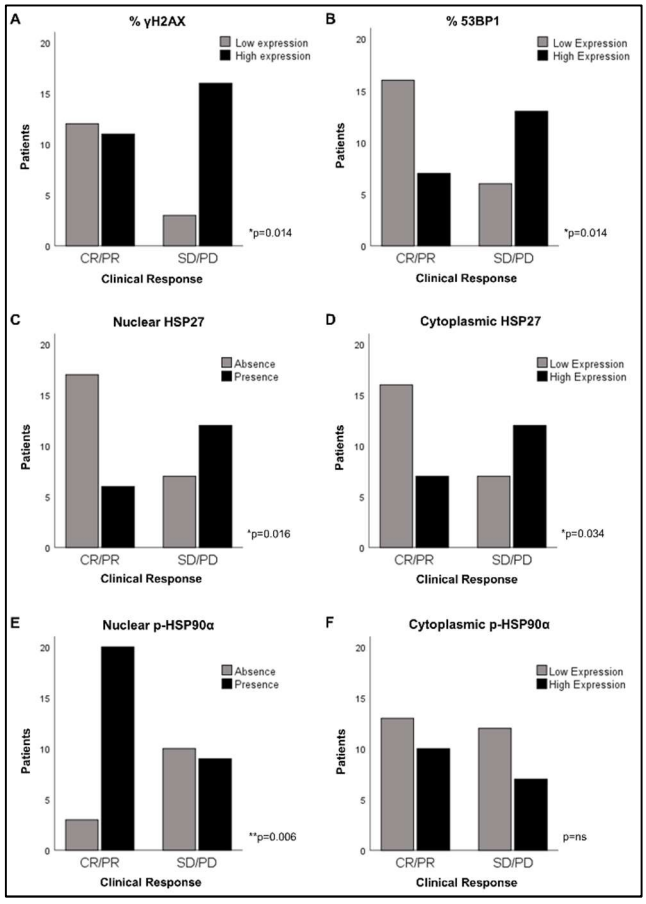


Figura 12. Expresión (%) de γH2AX (A), 53BP1 (B), Hsp27 nuclear (C), Hsp27 citoplasmática (D), p-Hsp90α nuclear (E) y p-HSP90α citoplasmática (F) en pacientes según la respuesta clínica. CR (respuesta completa), PR (respuesta parcial), SD (enfermedad estable) y PD (enfermedad progresiva). Fisher's exact test. *P<0.05. **P<0.001.

3.2.3. Asociación entre la expresión de γH2AX o Hsp27 y la evolución de los pacientes.

Un total de veintisiete pacientes (52,9%) fallecieron durante el seguimiento. En el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, la elevada expresión de γH2AX se asoció con una SG (OS) más corta (P= 0,024; Figura 13A). La elevada expresión de γH2AX también se asoció con una SLE (DFS) más corta (P= 0,01; Figura 13B). OS y DFS fueron significativamente mayores en pacientes con baja expresión citoplasmática de Hsp27 que en aquellos con alta expresión de la proteína (P<0,001 y P=0,013, respectivamente; Figura 13C-D). Sin embargo, no se encontraron asociaciones significativas entre los niveles de 53BP1, Hsp27 nuclear, p-Hsp90α, MLH1, MSH2 o ERCC1 y la SG o la SLE en pacientes con cáncer.

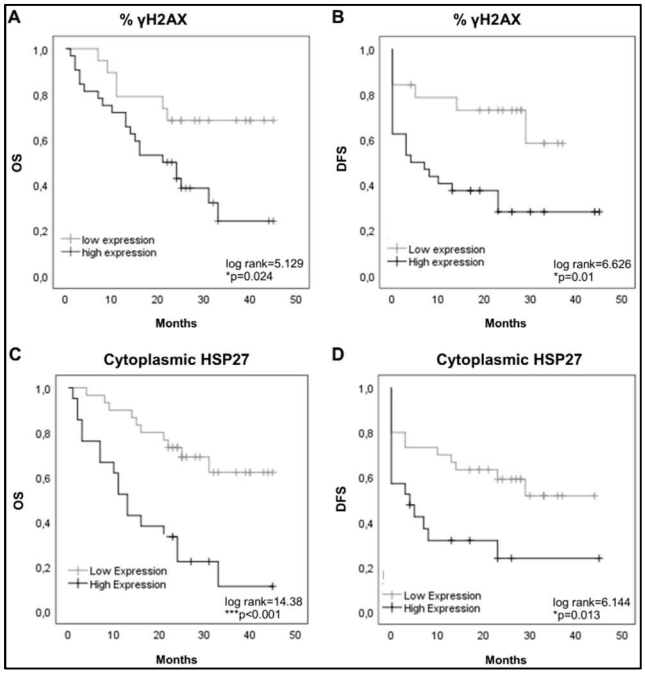


Figura 13. Curvas de Kaplan–Meier de supervivencia global (OS) y libre de enfermedad (DFS) para γH2AX y Hsp27 citoplasmática. Curva de OS (A) y DFS (B) para el % de γH2AX. Curva de OS (C) y DFS (D) para Hsp27 citoplasmática. *P<0.05.

Los resultados de la sección 2. en tejidos tumorales primarios fueron comunicados en:

"*Phosphorylated HSP90α as predictive and prognostic biomarker in tumors from patients treated with platinum analogs*". Cuello Carrión FD, Semino S, Ibarra J, González L, García MB, Vargas Roig LM, Nadin, SB. XXXVII Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo, San Luis, 5 y 6 de diciembre. Presentación en poster. Link libro de resúmenes: https://sbcuyo.org.ar/wp-content/uploads/2019/12/Libro-de-resumenes-2019.pdf. Abstract #62, pág. 39. BIOCELL, Vol.44, Suppl.1, pp. 31, 2020.

Los mismos fueron publicados en revista Internacional con referato:

"DNA damage repair proteins, HSP27 and phosphorylated-HSP90α as predictive/prognostic biomarkers of platinum-based cancer chemotherapy: an exploratory study". Sottile ML, Cuello-Carrión FD, Gomez LC, Semino S, Ibarra J, García MB, González L, Vargas-Roig LM, Nadin SB. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2022 Jul 1;30(6):425-434. doi: 10.1097/PAI.0000000000001037.

CONCLUSIONES

Las drogas análogas del platino se usan como quimioterapia de primera línea para el tratamiento de múltiples tipos de tumores malignos. En este trabajo estudiamos por un lado el valor predictivo y pronóstico del daño en el ADN y la expresión de γH2AX, 53BP1 y p-Hsp90α. Nuestros resultados indican que la evaluación del daño en el ADN mediante *alkaline comet assay* y la expresión de p-HSP90α en LSP de pacientes obtenidos antes de la quimioterapia e incubados *in vitro* con cPt podría predecir la respuesta clínica al tratamiento oncológico. Los pacientes con buena respuesta clínica a la quimioterapia presentaron mayor porcentaje de células con daño total y mayor expresión nuclear de p-HSP90α (relación N/C). Además, los pacientes cuyos LSP mostraron mayor daño en el ADN y daño total inducido por cPt tuvieron mayor supervivencia libre de enfermedad y global. Estos resultados señalan la importancia del estudio de estos marcadores en LSP (muestra accesible, simple y de bajo costo) por su valor predictivo y pronóstico, permitiendo al oncólogo clínico un cambio en el esquema terapéutico y así brindar al paciente la alternativa más eficaz que evite la resistencia a la quimioterapia basada en el uso de cPt.

Además, reportamos la utilidad de p-Hsp90α, Hsp27, γH2AX y 53BP1 como biomarcadores predictivos de respuesta a la quimioterapia basada en platino en tumores primarios. Nuestro estudio reveló que las expresiones elevadas de γH2AX y 53BP1 constituyen marcadores predictivos negativos (desfavorable) a la quimioterapia basada en platino. La alta expresión de γH2AX también puede servir como marcador pronóstico de la enfermedad. γH2AX y 53BP1 son indicadores sensibles del daño en el ADN; su aumento puede reflejar alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN, uno de los sellos distintivos característicos del cáncer implicados en la resistencia a la quimioterapia. También reportamos que la ausencia de Hsp27 en el núcleo o su baja expresión citoplasmática en el tumor son marcadores predictivos positivos. Se sabe que Hsp27 promueve la supervivencia celular a través de la función antiapoptótica e incluso modulando la reparación del ADN, habiéndose relacionado con resistencia a la quimioterapia. Esto último sienta las bases para promover el uso de la proteína Hsp27 como diana molecular terapéutica. El conocimiento de la expresión de Hsp27 en núcleo o citoplasma de las células tumorales podría proporcionar al oncólogo herramientas para optimizar la respuesta clínica a la quimioterapia y la supervivencia de los pacientes. Presentamos el primer estudio que destaca la importancia de estudiar la fosforilación en Thr5/7 de la proteína Hsp90α en tumores primarios y su valor predictivo y pronóstico. Además de Hsp27, la expresión nuclear de p-Hsp90α representa un marcador predictivo independiente para la respuesta a la quimioterapia basada en platino en pacientes con cáncer. Es importante analizar la localización subcelular de Hsp27 y p-Hsp90α debido a su relevancia en la evolución de los pacientes con cáncer. Además, nuestros hallazgos sugieren la utilidad pronóstica de la evaluación inmunohistoquímica de Hsp27 y γH2AX en tejidos tumorales primarios antes del tratamiento del cáncer basado en platino. Serán necesarios estudios multicéntricos con mayor número de pacientes y utilizando diferentes tipos de tumores para validar su uso. Las características individuales e intrínsecas de cada tumor pueden condicionar la eficacia del tratamiento oncológico, de ahí que la evaluación de los marcadores relacionados con la DDR pueda permitir a los oncólogos clínicos proporcionar alternativas de tratamiento más efectivas y personalizadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rottenberg S, Disler C, Perego P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2021;21(1):37-50.
2. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nat Rev Cancer. 2007;7(8):573-584.
3. Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. Crit Rev Oncol Hematol. 2007;63(1):12-31.
4. Langie SA, Azqueta A, Collins AR. The comet assay: past, present, and future. Front Genet. 2015 Aug 13;6:266. doi: 10.3389/fgene.2015.00266.
5. Gunasekarana V, Raj GV, Chand P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. J Clin Diagn Res. 2015 Mar;9(3):GE01-5. doi: 10.7860/JCDR/2015/12062.5622.
6. Declan J. McKenna, Stephanie R. McKeown, Valerie J. McKelvey-Martin, Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer, Mutagenesis, Volume 23, Issue 3, May 2008, Pages 183–190, https://doi.org/10.1093/mutage/gem054.
7. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Drago G, Ibarra J, Ciocca DR. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: a pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. Cancer Lett. 2006 Jul 28;239(1):84-97. doi: 10.1016/j.canlet.2005.07.025.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-674.
9. Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. Cell. 2017;168(4):644-656.
10. Georgoulis A, Vorgias CE, Chrousos GP, Rogakou EP. Genome Instability and γH2AX. Int J Mol Sci. 2017;18(9).
11. Mirza-Aghazadeh-Attari M, Mohammadzadeh A, Yousefi B, et al. 53BP1: A key player of DNA damage response with critical functions in cancer. DNA Repair (Amst). 2019;73:110-119.
12. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet. 1988;22(1):631-677.
13. Acunzo J, Katsogiannou M, Rocchi P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), αB-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. Int J Biochem Cell Biol. 2012;44(10):1622-1631.
14. Sottile ML, Nadin SB. Heat shock proteins and DNA repair mechanisms: an updated overview. Cell Stress Chaperones. 2018;23(3):303-315.
15. Saini J, Sharma PK. Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer. Curr Drug Targets. 2018;19(13):1478-1490.
16. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. Cell Stress Chaperones. 2005;10(2):86-103.
17. Falsone SF, Gesslbauer B, Tirk F, et al. A proteomic snapshot of the human heat shock protein 90 interactome. FEBS Lett. 2005;579(28):6350-6354.

18. Perdew GH, Hord N, Hollenback CE, Welsh MJ. Localization and Characterization of the 86- and 84-kDa Heat Shock Proteins in Hepa 1c1c7 Cells. Exp Cell Res. 1993;209(2):350-356.

19. Elaimy AL, Ahsan A, Marsh K, et al. ATM is the primary kinase responsible for phosphorylation of Hsp90α after ionizing radiation. Oncotarget. 2016;7(50):82450-82457.

20. Quanz M, Herbette A, Sayarath M, et al. Heat shock protein 90α (Hsp90α) is phosphorylated in response to DNA damage and accumulates in repair foci. J Biol Chem. 2012;287(12):8803-8815.

21. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Drago G, Ibarra J, Ciocca DR. Hsp27, Hsp70 and mismatch repair proteins hMLH1 and hMSH2 expression in peripheral blood lymphocytes from healthy subjects and cancer patients. Cancer Lett. 2007 Jul 8;252(1):131-46. doi: 10.1016/j.canlet.2006.12.028.

22. Nadin SB, Sottile ML, Montt-Guevara MM, Gauna GV, Daguerre P, Leuzzi M, Gago FE, Ibarra J, Cuello-Carrión FD, Ciocca DR, Vargas-Roig LM. Prognostic implication of HSPA (HSP70) in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. Cell Stress Chaperones. 2014 Jul;19(4):493-505. doi: 10.1007/s12192-013-0475-2.

23. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. J Histochem Cytochem. 2001 Sep;49(9):1183-6. doi: 10.1177/002215540104900912.

24. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer. 2009;45(2):228-247.

ABSTRACT

Platinum analogs are antineoplastic agents widely used for the treatment of solid tumors. Cisplatin (cPt) cytotoxicity is mediated by the formation of DNA cross-links (adducts). Molecular mechanisms of cPt resistance are complex. The Heat Shock Proteins (HSPs) have been related with cPt resistance. Previously, we reported that higher nuclear Hsp27 levels in peripheral blood lymphocytes (PBL) correlated with longer disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in cPt-treated cancer patients. We also reported that comet assay can predict chemotherapy response. Objectives: 1) *To determine in pre-chemotherpay PBL from cancer patients in vitro exposed to cPt the DNA damage and the expresión of γH2AX, 53BP1, Hsp27 and p-Hsp90α*; 2) To evaluate *γH2AX, 53BP1, Hsp27 and p-Hsp90α expressions in primary tumor tissues*; 3) To establish if *γH2AX, 53BP1, Hsp27 and p-Hsp90α in PBL and tumors correlate with clinical response and patients' survival*. Comet assay and immunohisto/cytochemistry were done. Ten healthy individuals and fifty-three cancer patients were included. PBL were obtained before chemotherapy, exposed to cPt and collected at: T0 (immediately after cPt), T24 and T48 (24h and 48h, respectively). PBL in patients showed that high total DNA damage levels and high nuclear p-Hsp90α at T0 that were associated with better clinical response (P<0,05). No statistically significant differences between healthy subjects and patients in

the basal levels of the markers were found. cPt treatment increased nuclear p-Hsp90α and γH2AX in PBL from healthy individuals and patients (P<0,05). High DNA damage after cPt was associated with longer DFS and OS (P<0,05). In primary tumors, elevated γH2AX and 53BP1 expressions were associated with poor clinical response. Nuclear expression of p-Hsp90α, and nuclear absence or reduced cytoplasmic Hsp27 correlated with good clinical response. High tumor expression levels of γH2AX and cytoplasmic Hsp27 were associated with shorter OS and DFS. Our data indicate the potential predictive/prognostic utility of the DNA damage and p-Hsp90α and γH2AX measurement in cPt-treated PBL. We also reported the predictive/prognostic usefulness of p-Hsp90α, Hsp27, γH2AX and 53BP1 evaluation in primary tumors. These markers could anticipate the individual chemotherapy, allowing to change the therapeutic scheme in non-responder's patients.

RELACIÓN FENOTIPO - GENOTIPO Y ESPECTRO DE VARIANTES GENÉTICAS EN PACIENTES CON HIPERTRIGLICERIDEMIA SEVERA EN LA POBLACIÓN ARGENTINA

Juan Patricio Nogueira

Hospital Central de Formosa

INTRODUCCIÓN

La hipertrigliceridemia (HTG) es una condición médica común asociada con el aumento de los niveles de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrón, y en ciertos casos, se asocia con un aumento del riesgo cardiovascular y pancreatitis [1, 2]. Basado en datos genéticos recientes, el desorden se ha redefinido en dos tipos: HTG severo con niveles de triglicéridos (TG) mayores que 10mmol/L (>880mg/dL) o>500mg/dL, que es más probable que tenga una causa monogénica, y HTG leve a moderado con niveles de TG entre 2-10mmol/L (150-880 mg/dl) o 150-500 mg/dl [3, 4]. HTG puede ser producido por causas primarias asociadas con trastornos genéticos en el metabolismo de los lípidos y por causas secundarias, tales alcoholismo, enfermedad biliar y diabetes descontrolada [5].

Hay dos causas comunes de hipertrigliceridemia severa que abordamos en este estudio. En primer lugar, el síndrome de quilomicronemia familiar (SFC) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen de la lipoproteína lipasa (LPL) o, más raramente, por mutaciones de pérdida de función en la apolipoproteína C-II (APOC2), apolipoproteína A-V (APOA5), glicosil-fosfatidilino sitol anclado proteína de alta densidad de unión a lipoproteínas 1 (GPIHBP1) y y genes de maduración de lipasa 1 (LMF1) que codifican proteínas relacionadas con su modulación [6]. El FCS es un trastorno del metabolismo de los lípidos, especialmente los quilomicrones, en los que los TG aumentan considerablemente. Se estima que podría haber aproximadamente 3000 a 5000 pacientes en todo el mundo con FCS [7]. A nivel general, se han notificado tasas de prevalencia de 1 a 2 casos por cada 1000.000 habitantes [8], y en algunas poblaciones con un efecto fundador, se pueden encontrar tasas de prevalencia de 1 caso por cada 100.000 habitantes [9]. Clínicamente, esta condición se caracteriza por dolor abdominal recurrente, hepatomegalia, esplenomegalia, xantomas eruptivos como manifestación cutánea, disminución de los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y bajo índice de masa corporal (IMC) y, lo más importante, pancreatitis [10, 11, 12]. Un metaanálisis reciente ha mostrado las tasas de complicaciones y mortalidad por pancreatitis aguda (PA), estableciendo que aumentaron significativamente en pacientes con TG >5,6 mM (>500 mg/dL) o > 11,3 mM (>1000 mg/dL) versus <5,6 mM (<500 mg/dL) o < 11,3 mM (<1000 mg/dL), respectivamente [13].

Por otro lado, el síndrome de quilomicronemia multifactorial (MCS) es un trastorno poligénico y la causa más frecuente de SC que resulta de la presencia de variantes genéticas múltiples que incluyen ambas variantes heterozoicas raras en el LPL, APOC2, APOA5, apolipopro-tein B (APOB), la proteína reguladora de glucoquinasa (GCKR),

LMF1, GPIHBP1, y los genes cíclicos de proteína de unión a elementos AMP 3-like (CREB3L3) y variantes más frecuentes en ~40 genes [14]. La Hipertrigliceridemia se desencadena por la presencia de factores secundarios tales como una dieta rica en grasas y azúcares simples, obesidad, hipertensión, consumo de alcohol y diabetes incontrolada. De hecho, los determinantes genéticos que predisponen al SCM son la presencia de una variante rara heterocigota o una acumulación de varios SNPs (oligo/poligénicos).

En los pacientes con MCS, la quilomicronemia ocurre típicamente más adelante en vida. Se ha estimado que esta quilomicronemia se puede encontrar en 1:600 adultos, pero los pacientes con SFC representan solo el 5% de estos individuos [15]. Clínicamente, los niveles séricos altos de TG y quilomicronemia también son característicos de la MCS, junto con una presentación similar a la FCS pero con una etiología subyacente diferente. En comparación con el FCS, los pacientes con este trastorno también pueden tener TG en ayunas de 880 mg/dL, lo que aumenta el riesgo de PA [16, 17, 18].

Con respecto a la información mencionada anteriormente, el objetivo de este estudio fue describir las características clínicas y paraclínicas de los pacientes con resultados de HTG severos de un programa de cribado para hipertrigliceridemia severa en Argentina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron tres fases en la selección de pacientes de manera progresiva, como sigue:

En la primera etapa, los casos sospechosos, basados en los hallazgos de laboratorio, se definieron como pacientes con niveles de triglicéridos de 500 mg/dl.

En la segunda fase, se determinaron todos los casos sospechosos basándose en los resultados de laboratorio con niveles de TG, LDL, colesterol, HDL y APOB que también nos permitieron excluir y APOB que también nos permitió excluir a aquellos con factores secundarios.

En el tercer estadio, se excluyó se comparó los paciente con SFC < 8 vs>8 SFC. En el segundo estadio se excluyó a los pacientes con factores secundarios de HTG. Los pacientes restantes fueron a una consulta médica para recoger la información actual y solicitar un nuevo perfil lipídico APOB y hemoglobina glicosida (HbA1c). En una tercera etapa se realizó una posterior aplicación del Score de Quilomicronemia Familiar de Moulin, el cual es reportado en la literatura como un sistema de puntuación para el diagnóstico diferencial de SFC [10, 19]. Los datos fueron sistematizados a través de un cuestionario de datos clínicos diseñado en la plataforma REDcap para garantizar la estandarización en la recolección, así como la confidencialidad y la calidad de datos. Adicionalmente, como parte de la exploración y caracterización de HTG, se ajustó un modelo de regresión logística multivariable para la variable utilizando valores de triglicéridos mayores e iguales a 1000mg/dL, en los que se incluyeron múltiples otras variables. Se realizó en análisis estadístico con el programa SPSS, se consideró un valor de p value<0,05.

RESULTADOS

Un total de 2415 sujetos presentaron valores de TG superiores a 500 mg/dL. En cuanto a la distribución por sexo, se encontró a 1632 hombres correspondieron al 68%, y 783 mujeres al 32%. La prevalencia de hipertensión arterial en el grupo evaluado fue de 32%,

y la de pancreatitis fue de 0,6%. Un total de 2,4% de los pacientes cumplieron la definición de caso probable. En la tabla 1 se presentan otras características de laboratorio. En el modelo de regresión ajustada (tabla 2), los factores independientes asociados con HTG grave fueron sexo masculino (OR 1,5, CI95% 1,1 - 2,1), diabetes mellitus (OR 1,5% CI95 1,1 - 2,1) y FCS mayor de 8 puntos (OR 1,3% CI95 1,3 - 1,4). Por el contrario, la obesidad (OR 0,53 CI95% 0,3 - 0,9) se asoció con una menor frecuencia en el grupo con HTG grave.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los pacientes clasificados como presuntos casos clínicos.

	N = 2415*
Sex	
F	783 (32%)
M	1632 (68%)
Edad	52 (12)
Hipertensión Arterial	771 (32%)
Diabetes mellitus	483 (20%)
Obesidad	305 (13%)
Pancreatitis	15 (0.6%)
clasificación	
FCS Score < 8	2357 (98%)
FCS Score >= 8	58 (2.4%)
BMI (kg/m^2)	27.6 (5.6)
HDL (mg/dl)	35 (9)

LDL (mg/dl)	104 (40)
Triglycerides (mg(dl)	705.37 (335.9)
TG Clasificación	
500-1000 mg/dl	2170 (90%)
1000-1500 mg/dl	188 (7.8%)
>1500 mg/dl	57 (2.4%)

*n (%); Media (SD)

Tabla 2. Análisis de regresión logística múltiple para triglicéridos superiores a 1000 mg/dl.

	OR[1]	95% CI[1]	*P* value
Sexo	1.51	1.11, 2.08	0.011
Diabetes mellitus	1.55	1.12, 2.13	0.007
Obesidad	0.53	0.31, 0.86	0.015
Score	1.34	1.26, 1.43	<0.001

[1]OR = Odds Ratio Adjust, CI = Intervalo de confianza.

Tabla 4. Análisis comparativo para la identificación de factores asociados a un caso probable de quilomicronemia familiar.

	Score < 8, N = 2,357	Score >= 8, N = 58[1]	*P* value[2]
Sexo			0.053
M	771 (33)	12 (21)	

H	1586 (67)	46 (79)	
Edad	52 (12)	50 (11)	0.3
Hipertensión Arterial	760 (32)	11 (19)	0.032
Diabetes mellitus	461 (20)	22 (38)	<0.001
Obesidad	303 (13)	2 (3.4)	0.033
Pancreatitis	11 (0.5)	4 (6.9)	<0.001
BMI (kg/m^2)	27.6 (5.3)	26.8 (7.4)	0.6
HDL (mg/dl)	35 (9)	29 (8)	<0.001
LDL (mg/dl)	105 (40)	76 (40)	<0.001
TG (mg(dl)	469 (357)	1,033 (905)	<0.001

n (%); Media (SD)

RESUTADOS

Describimos un programa de detección de HTG grave en Formosa, Argentina. Aunque la HTG tiene una presentación frecuente en la práctica clínica, la HTG grave tiene una prevalencia de solo el 1,7% en los Estados Unidos [20] y la FCS representa el 1-3% de los HTG graves [12]. La prevalencia de HTG grave en el presente estudio fue del 3% (IC del 95%: 2,9 - 3,2) (n = 2415), IC del 95%: 0,0000657-0,16) de esos HTG graves, probablemente debido a un punto de corte diferente. Las manifestaciones clínicas de HTG son similares a las de MCS y FCS, con síntomas que se extienden desde xantomas eruptivos, lipemia retinalis y hepatoesplenomegalia a episodios recurrentes de PA. Se estima que hasta el 85% de los pacientes con HTG grave de cualquier etiología desarrollarán PA en algún momento de su vida [20]. En nuestro estudio, la prevalencia de PA en pacientes con puntaje FCS 8 fue significativamente mayor (6,9%) que en aquellos con puntaje<8 (0,5%) (tabla 4). Thong et al. encontraron en un estudio que en una población con HTG muy grave, el 13,4% de los pacientes con pancreatitis aguda inducida por HTG presentaba dislipemia, el 15,9% hipertensión y el 28% diabetes mellitus tipo 2 [20]. En el presente estudio, 28, 32,43 y 19,6% de los pacientes fueron identificados con dislipidemia, hipertensión y DM2, respectivamente. Además, se encontró una prevalencia de obesidad del 12,9%, cifra inferior a la observada en el estudio

noruego, que fue del 41,6% [18]. Por otro lado, Pedragosa et al. encontraron que el 10,2% de los pacientes con HTG muy grave presentaba algún episodio de pancreatitis, el 54% de los pacientes tenía esteatosis hepática, el 4,2% tenía cálculos biliares, el 3,4% tenía cardiopatía isquémica, el 2,3% tenía cerebrovascu-enfermedad enfermedad lar y 2,7% tenían enfermedad arterial periférica [21]. Estos hallazgos sugieren que aunque la pancreatitis es una complicación importante, es importante estar al tanto de los eventos cardiovasculares también. Goldberg et al. propusieron que los pacientes con SFC son más jóvenes y tienen menos probabilidades de tener alguno de los factores agravantes de la HTG que los pacientes con MCS, pero tienen más probabilidades de desarrollar pancreatitis, probablemente debido a una quilomicronemia sostenida de por vida [22]. Son menos propensos a padecer enfermedades cardiovasculares que aquellos con MCS debido a la reducción severa de la actividad de la LPL, que reduce la formación y acumulación de quilomicrón aterogénico y remanente de VLDL que puede ocurrir en la MCS [22]. Es importante evaluar no solo a los pacientes con SFC, sino también a los pacientes con MCM, ya que aquellos con algunas variantes raras podrían estar predispuestos a fenotipos peores. Paquette et al. sugieren la realización de pruebas genéticas de detección en pacientes con TG de 10 mmol/l para identificar a aquellos con mayor riesgo de PA [23]. Sin embargo, este no era el propósito de este estudio. Sin embargo, este no era el propósito de este estudio. Se buscó describir un programa de cribado de SFC con abordaje por etapas, en el que las puntuaciones >8 o<8 permitieron analizar dos subgrupos de pacientes con SFC y MCM.

CONCLUSIÓN

Esta patología es infrecuente pero tiene un alto impacto en la calidad de vida y en las familias de quienes la padecen. Por lo tanto, es crucial considerar que un paciente con HTG grave puede someterse a un análisis molecular para mejorar el pronóstico y los resultados. Destacamos los beneficios de realizar más estudios dirigidos a todas las poblaciones. De esta manera, nuestro estudio contribuirá al conocimiento epidemiológico y al perfil de los pacientes con HTG.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cepeda LL, Ramos-Garibay JA, Calderón DP, Reyes M. Xantomas eruptivos como manifestación inicial de diabetes mellitus e hipertrigliceridemia severa. 2010;19:4.
2. Tamez-Pérez HE, Sáenz-Gallegos R, Hernández-Rodríguez K, Forsbach-Sánchez G, Gómez-de Ossio MD, Fernández-Garza N, et al. Terapia con insulina en pacientes con hipertrigliceridemia severa. 2006;44(3):235–7.
3. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M, et al. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. Lancet Diabetes Endocrinol. 2014 Aug;2(8):655–66.
4. Virani SS, Morris PB, Agarwala A, Ballantyne CM, Birtcher KK, Kris-Etherton PM, et al. 2021 ACC Expert Consensus Decision Pathway on the Management of ASCVD Risk Reduction in Patients With Persistent Hypertriglyceridemia. J Am Coll Cardiol. 2021 Aug;78(9):960–93.
5. Herrera Del Águila DD, Garavito Rentería J, Linarez Medina K, Lizarzaburu Rodríguez V. Pancreatitis aguda por hipertrigliceridemia severa: reporte de caso y

revisión de la literatura. Rev Gastroenterol Perú. 2015 Apr;35(2):159–64.

6. Chokshi N, Blumenschein SD, Ahmad Z, Garg A. Genotype-phenotype relationships in patients with type I hyperlipoproteinemia. J Clin Lipidol. 2014 May;8(3):287–95.
7. Davidson M, Stevenson M, Hsieh A, Ahmad Z, Roeters van Lennep J, Crowson C, et al. The burden of familial chylomicronemia syndrome: Results from the global IN-FOCUS study. J Clin Lipidol. 2018 Jul;12(4):898-907.e2.
8. Bchetnia M, Bouchard L, Mathieu J, Campeau PM, Morin C, Brisson D, et al. Genetic burden linked to founder effects in Saguenay–Lac-Saint-Jean illustrates the importance of genetic screening test availability. J Med Genet. 2021 Oct;58(10):653–65.
9. Gaudet D, Stevenson M, Komari N, Trentin G, Crowson C, Hadker N, et al. The burden of familial chylomicronemia syndrome in Canadian patients. Lipids Health Dis. 2020 Dec;19(1):120.
10. Moulin P, Dufour R, Averna M, Arca M, Cefalù AB, Noto D, et al. Identification and diagnosis of patients with familial chylomicronaemia syndrome (FCS): Expert panel recommendations and proposal of an "FCS score." Atherosclerosis. 2018 Aug;275:265–72.
11. Gallo A, Béliard S, D'Erasmo L, Bruckert E. Familial Chylomicronemia Syndrome (FCS): Recent Data on Diagnosis and Treatment. Curr Atheroscler Rep. 2020 Nov;22(11):63.
12. Baass A, Paquette M, Bernard S, Hegele RA. Familial chylomicronemia syndrome: an under-recognized cause of severe hypertriglyceridaemia. J Intern Med. 2020 Apr;287(4):340–8.
13. Kiss L, Fűr G, Mátrai P, Hegyi P, Iványi E, Cazacu IM, et al. The effect of serum triglyceride concentration on the outcome of acute pancreatitis: systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 2018 Sep 20;8(1):14096.
14. Dron JS, Dilliott AA, Lawson A, McIntyre AD, Davis BD, Wang J, et al. Loss-of-Function *CREB3L3* Variants in Patients With Severe Hypertriglyceridemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020 Aug;40(8):1935–41.
15. Paquette M, Bernard S, Hegele RA, Baass A. Chylomicronemia: Differences between familial chylomicronemia syndrome and multifactorial chylomicronemia. Atherosclerosis. 2019 Apr;283:137–42.
16. O'Dea LSL, MacDougall J, Alexander VJ, Digenio A, Hubbard B, Arca M, et al. Differentiating Familial Chylomicronemia Syndrome From Multifactorial Severe Hypertriglyceridemia by Clinical Profiles. J Endocr Soc. 2019 Dec 1;3(12):2397–410.
18. Retterstøl K, Narverud I, Selmer R, Berge KE, Osnes IV, Ulven SM, et al. Severe hypertriglyceridemia in Norway: prevalence, clinical and genetic characteristics. Lipids Health Dis. 2017 Dec;16(1):115.
19. Ruiz-García A, Arranz-Martínez E, López-Uriarte B, Rivera-Teijido M, Palacios-Martínez D, Dávila-Blázquez GM, et al. Prevalencia de hipertrigliceridemia en adultos y factores cardiometabólicos asociados. Estudio SIMETAP-HTG. Clínica E Investig En Arterioscler. 2020 Nov;32(6):242–55.
20. Thong VD, Mong Trinh NT, Phat HT. Factors associated with the severity of hypertriglyceridemia induced acute pancreatitis. Medicine (Baltimore). 2021 May

28;100(21):e25983.

21. Pedragosa À, Merino J, Aranda JL, Galiana J, Godoy D, Panisello JM, et al. Perfil clínico de los pacientes con hipertrigliceridemia muy severa del Registro de Hipertrigliceridemias de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. Clínica E Investig En Arterioscler. 2013 Jan;25(1):8–15.
22. Goldberg RB, Chait A. A Comprehensive Update on the Chylomicronemia Syndrome. Front Endocrinol. 2020 Oct 23;11:593931.
23. Paquette M, Amyot J, Fantino M, Baass A, Bernard S. Rare Variants in Triglycerides-Related Genes Increase Pancreatitis Risk in Multifactorial Chylomicronemia Syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2021 Aug 18;106(9):e3473–82.

ABSTRACT

Familial chylomicronemia syndrome (FCS) is a rare autosomal recessive metabolic disorder caused by mutations in genes involved in chylomicron metabolism. On the other hand, multifactorial chylomicronemia syndrome (MCS) is a polygenic disorder and the most frequent cause of chylomicronemia, which results from the presence of multiple genetic variants related to chylomicron metabolism, in addition to secondary factors. Indeed, the genetic determinants that predispose to MCS are the presence of a heterozygous rare variant or an accumulation of several SNPs (oligo/polygenic). However, their clinical, paraclinical, and molecular features are not well established. The objective of this study was to describe the development and results of a screening program for severe hypertriglyceridemia in Argentina.

Methods A cross-sectional study was performed. All patients aged >18 years with triglyceride levels ≥500 mg/dL from 2019 to 2021 were included. The program was developed in three stages: 1. Review of electronic records and identification of suspected cases based on laboratory findings (triglyceride levels ≥500 mg/dL); 2. Identification of suspected cases based on laboratory findings that also allowed us to exclude secondary factors.

Results: In total, we categorized 2415 patients as suspected clinical cases with a mean age of 53 years, of which 68% corresponded to male patients. The mean triglyceride levels were 705.37 mg/dL (standard deviation [SD] 335.9 mg/ dL). After applying the FCS score, 2.4% (n = 18) of patients met the probable case definition. Additionally, for an apparent prevalence of familial chylomicronemia in the consulting population of 0.41 per 1.000 patients with severe HTG measurement.

Conclusion This study describes a screening program for the detection of severe hypertriglyceridemia. We believe that more programs of these characteristics should be developed in our region, given the importance of early detection of this metabolic

VIGILANCIA MOLECULAR DE ESCHERICHIA COLI PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STEC) EN MATERIA FECAL, EN LOS CONTACTOS CERCANOS DE PACIENTES CON SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)

Marina S. Palermo, Gabriela A. Fiorentino

Laboratorio de Patogénesis e Inmunología de Procesos Infecciosos.
Instituto de Medicina Experimental. IMEX - CONICET - ANM

INTRODUCCIÓN

El término microangiopatías trombóticas (MAT) se refiere a un grupo de enfermedades que son enfermedades raras y potencialmente mortales, caracterizadas por disfunción endotelial y la formación de trombos ricos en plaquetas y fibrina en vasos sanguíneos pequeños. La microangiopatía puede provocar un consumo secundario de plaquetas y una alteración mecánica de los eritrocitos, lo que conduce a las manifestaciones hematológicas típicas de MAT: trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática (formación de esquistocitos, aumento de la enzima lactato deshidrogenasa y reducción de la haptoglobina). Previamente, las MAT se clasificaron según su presentación clínica. Así en la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) predomina la presentación con síntomas neurológicos, mientras que en el síndrome urémico hemolítico (SUH) predomina la lesión renal aguda (IRA). Sin embargo, existe una superposición significativa en las características clínicas de la PTT y el SUH y ahora las enfermedades se clasifican según la etiología. La clasificación del SUH es más compleja, ya que un patrón de enfermedad clínica compatible con el SUH puede ocurrir en una amplia gama de escenarios clínicos. La mayoría de los casos (90%) ocurren después de una infección con una bacteria productora de toxina Shiga, generalmente *Escherichia coli* enterohemorrágica (STEC), y generalmente afectan a los niños. El 10% restante de los casos se ha agrupado tradicionalmente como SUH atípico [1,2].

Si bien durante los últimos años hubo grandes avances en el conocimiento de la fisiopatología y clasificación de estas condiciones, el diagnóstico diferencial sigue siendo un desafío para los médicos pediatras y/o nefrólogos. Un diagnóstico rápido y preciso es esencial para garantizar el tratamiento indicado y brindar al paciente las mejores oportunidades para un resultado bueno y rápido.

El SUH típico o asociado a STEC es motivo de gran preocupación en Argentina [3,4]. De hecho, es la causa más común de insuficiencia renal aguda en niños, y se considera una enfermedad endemo-epidémica, siendo el país con la tasa de incidencia más alta del mundo [4,5]. La mayoría de los casos de SUH se asocian con STEC, siendo O157:H7, la cepa más frecuente seguida de O145: NM, O121:H19, O26:H11 and O103:H2 [5,6].

Idealmente, se debería realizar un cultivo fecal en todos los pacientes con MAT, independientemente de si hubo un pródromo de diarrea o no [1]. Sin embargo, debido a la baja carga de bacterias patógenas necesarias para desencadenar la enfermedad y al

tiempo transcurrido entre el inicio de la diarrea y el diagnóstico de SUH, se suele realizar una técnica de alta sensibilidad en estas muestras, como es la PCR para detectar la presencia de genes de la toxina Shiga [7,8].

La variabilidad en las características clínicas de los pacientes en el momento de la presentación hace que sea necesario complementar el diagnóstico para conocer la etiología de la MAT a fin de establecer el tratamiento correcto. De hecho, el diagnóstico y el tratamiento oportuno pueden salvar vidas. Algunos pacientes con SUH presentan algunas, pero no todas, las anomalías observadas en el SUH típico, lo que dificulta establecer un diagnóstico preciso [9].

El presente estudio describe el diagnóstico de 32 pacientes con SUH atendidos en el Hospital Municipal del Niño de San Justo, Provincia de Buenos Aires, durante el período 2017-2020. El objetivo fue mejorar el diagnóstico etiológico de los casos de SUH basado en la identificación de cepas de STEC. Analizamos la contribución de los anticuerpos anti-Lipopolisacárido (anti-LPS) en suero para confirmar los casos como SUH típico. Además, estudiamos a los familiares de los pacientes para detectar cepas patógenas circulantes que pudieran contribuir al diagnóstico de SUH del paciente y / o prevenir la diseminación de brotes familiares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y muestras.

Se trata de un estudio unicéntrico retrospectivo que incluyó a todos los pacientes que se presentaron con patrón clínico compatible con STEC-SUH entre marzo de 2017 y febrero de 2020 al servicio de Nefrología Pediátrica del Hospital de Niños “Prof. Dr RA Exeni”, San Justo, Buenos Aires. Este estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por los Comités de Ética Hospitalaria. Todos los pacientes se inscribieron en este estudio después de obtener el consentimiento informado de sus padres. En total, se estudiaron 32 niños ingresados en el hospital mencionado durante el período agudo de la enfermedad por SUH. Se obtuvieron muestras de heces o hisopados rectales, así como muestras de sangre en el momento de la hospitalización. Los criterios para el diagnóstico fueron anemia hemolítica microangiopática con esquistocitos, trombocitopenia (recuento de plaquetas $<150 \times 10^9$ / L) y nivel anormal de creatinina (creatinina sérica> 62 µmol / L si era <5 años). Se recopilaron todos los datos clínicos y bioquímicos disponibles. Los pacientes se clasificaron según los criterios de Gianantonio considerando los días de anuria [10]. El inicio de la enfermedad se definió como el primer día de diarrea. La ventana de tiempo de las pruebas de diagnóstico fecal y el ensayo de anticuerpos serológicos se definió como el tiempo entre el inicio de los síntomas y la recolección de heces y / o suero.

Diagnóstico fecal.

Las heces se recolectaron lo antes posible después de la admisión al hospital. En los casos en que no se pudieron obtener las heces, se realizó un hisopado rectal. La materia fecal se sembró directamente sobre agar Sorbitol MacConkey que contenía 1% de sorbitol (SMAC) (Difco Laboratories, Detroit, MI), y luego de dos cultivos enriquecidos con caldo de soja Trypticase (TSB) (Britania, Buenos Aires, Argentina) y caldo de soja Trypticase con suplemento de telurito de cefalexima (BioMerieux, Argentina) (TSB-CT) durante 6 hs a 37ºC.

Extracción de ADN bacteriano.

La extracción de ADN se realizó a partir de la confluencia del desarrollo bacteriano para cada cultivo nocturno (SMAC directo, TSB, TSB-CT) incubando en buffer 1X TE (Tris-Edta) (Invitrogen Life Technologies, Argentina) (Triton x-100) con 15 min de choque térmico a 100ºC. A continuación, se llevó a cabo una centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min, dejando el ADN extraído (libre) en el sobrenadante.

Ensayo de PCR.

Utilizando 3 pares de cebadores (primers), uno para cada gen a determinar (*stx1, stx2* y *rfbO157*), de acuerdo con el protocolo interno [11]. Los productos de la PCR se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% usando colorante rojo en gel (Biotium, Sigma-Aldrich, San Luis, MO) en una solución acuosa con xilencianol y glicerol. La visualización de las bandas se realizó mediante transiluminador UV (Maestrogen, Genbiotech SRL, Argentina). Para caracterizar aún más las cepas de STEC, todas las colonias aisladas se enviaron al Laboratorio Nacional de Referencia en bacterias Enterohemorrágicas (EHEC) y SUH, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán.

Diagnóstico serológico.

El suero de 27 de 32 pacientes con SUH se recogió al momento de la internación y se almacenó a -80 ° C hasta el análisis. La reactividad sérica contra el serotipo LPS (O157, O145, O121) se estableció mediante la medición mediante un ensayo comercial de glico-iELISA (CHEMLIS®, Buenos Aires, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los controles positivos y negativos para la presencia de anticuerpos contra cada antígeno de serotipo se procesan en paralelo en cada placa.

Análisis de estudios estadísticos.

Las variables continuas, como los datos bioquímicos, se informan como la mediana y rango intercuartílo (IQR). Los datos categóricos se presentaron como porcentaje y frecuencias. Las comparaciones entre variables distribuidas no paramétricamente se evaluaron mediante la prueba de Mann-Whitney. El análisis de frecuencia se realizó mediante la prueba exacta de Fisher. Se aplicó la prueba de Spearman para analizar la asociación entre los datos clínicos y bioquímicos con la gravedad renal del SUH, según los criterios de Gianantonio por días de anuria. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. Se utilizó el software Graphpad 8.0. e Infostat.

RESULTADOS

Características del paciente.

Durante el período comprendido entre 2017 y 2020, 32 pacientes con patrón clínico de SUH se presentaron en el Servicio de Nefrología Pediátrica del Hospital Municipal del Niño de San Justo. Los datos clínicos y bioquímicos de 31 pacientes se muestran en la Tabla 1. La mediana (rango) de edad de los pacientes fue 27,5 (9-60) meses y hubo 18 niñas (58,1%) y 13 niños (41,9%). (proporción de mujeres: hombres 1,38). La insuficiencia renal fue la manifestación orgánica más común en todos los pacientes, pero también se presentaron con frecuencia con uno o más órganos extrarrenales afectados.

Los síntomas gastrointestinales fueron la complicación extrarrenal más prevalente en pacientes con STEC-SUH.

Según los criterios de Gianantonio [10], los pacientes se clasificaron retrospectivamente considerando la gravedad de la disfunción renal como: casos leves (SUH I: sin anuria, n =7), Casos moderados (SUH II: <7 días de anuria, n =10) ó casos graves (SUH III: > 8 días de anuria, n =14). Sin embargo, los pacientes de SUH I y SUH II se agruparon y se denominaron SUH I + II (n = 17).

A pesar de que se observaron parámetros bioquímicos similares al inicio de la enfermedad algunos pacientes progresaron hacia un compromiso renal severo (SUH III), requiriendo más días de diálisis que los casos de SUH I + II (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros clínicos y bioquímicos. Los pacientes con SUH fueron agrupados según la severidad renal, basada en los criterios de Gianonatonio [10], observada retrospectivamente. Los resultados están expresados como mediana y rango. Los valores de p se obtuvieron mediante análisis estadístico de correlaciones mediante el modelo r de Spearman.

Datos clínicos/ laboratorio	Todos los pacientes SUH (n=31)	Pacientes SUH grado I, II (n=17)	Pacientes SUH grado III (n=14)	P value
Edad (meses)	27,5 (9-60)	24, (9-36)	31,5 (13-60)	
Sexo (ratio niñas/niños)	1.38	1.12	1.8	
Duración de la diarrea (días)	6 (3-11)	6 (3-11)	5 (3-10)	0,7674
Días de anuria	7 (0-21)	2 (0-7)	10 (8-21)	< 0,0001(****)
Días de diálisis	7 (0-20)	3 (0-13)	13 (8-20)	<0.0001(****)
Leucocitos totales x10^3/ul	13,6 (2,8-54,8)	13,6 (5,0-37,8)	12 (3,8-54,8)	0.9691
Plaquetas x10^3/ul	44 (10-522)	40 (10-522)	60,5 (19-276)	0.1684
Urea (mmol/L)	27 (1,5-71,8)	28,5 (1,5-71,8)	26,5 (13,3-55,3)	0.8465
Ácido Úrico (umol/L)	737,6 (101,1-951,8)	678,1 (101,1-951,8)	862,5 (588,9-945,8)	0.4605
Creatinina (umol/L)	300,5 (22,1-848,6)	273,2 (22,1-512,7)	362,4 (97,2-848,6)	0,0386(*)
Neutrófilos x10^3/ul	9,4(2-38,4)	8,6 (2-19,3)	12,2 (2,7-38,4)	0.1831
Hematocrito (%)	26 (15-35)	26 (15-33)	27 (22-35)	0.0991
N° of tranfusiones	2 (1-10)	3 (1-11)	2 (1-8)	0.6325
Hemoglobina (g/L)	95 (66-123)	89 (66-109)	98 (81-123)	0.0487 (*)

Sodio (mmol/L)	132,8 (120,3-143,6)	132,8 (129,3-143,6)	131,4 (120,3-143,4)	0.3779

Diagnóstico fecal por PCR.

El diagnóstico preciso de STEC-SUH requiere el aislamiento y la genotipificación del agente etiológico, es decir, la bacteria STEC. Para ello, se cultivaron muestras de heces de pacientes con SUH mediante siembra directa, o después de un período de cultivo de 6 h en dos caldos de enriquecimiento (TSB y TSB-CT), en placas de agar SMAC. Después de 24 horas, se realizó el estudio de los genes *stx1 / stx2 y rfbO157* en las colonias de la zona de confluencia del crecimiento bacteriano en SMAC mediante el uso de una PCR multiplex validada internamente, como se describió en Métodos. Doce de 32 (37,5%) casos de SUH mostraron bandas positivas por PCR multiplex; 6 de ellos fueron positivos para el genotipo *stx2 / rfbO157*, y los otros 6 fueron positivos solo para el gen *stx2* (Figura 1A). Como se puede observar, todas las cepas de STEC detectadas en pacientes con SUH portaban el gen *stx2* y ninguna el gen *stx1*. Los 20 pacientes restantes con SUH fueron negativos mediante el ensayo de PCR (ausencia de bandas por PCR). El ensayo de PCR nos permitió clasificar las muestras como STEC O157 cuando se detectaron los genes *stx2* y *rfbO157*, y STEC no-O157 cuando solo se detectó el gen *stx2*.

Nos preguntamos si el hecho de detectar algún gen bacteriano por PCR en las muestras fecales estaba asociado al intervalo de tiempo transcurrido entre el inicio de la enfermedad y la recolección de la muestra. Cuando analizamos esta variable, encontramos un tiempo ligeramente menor, pero no estadísticamente significativo, para el grupo de pacientes con una muestra positiva para el genotipo STEC O157 en comparación con otros grupos: aquellos con muestras positivas para el genotipo STEC no-O157 o negativas por PCR Figura 1B).

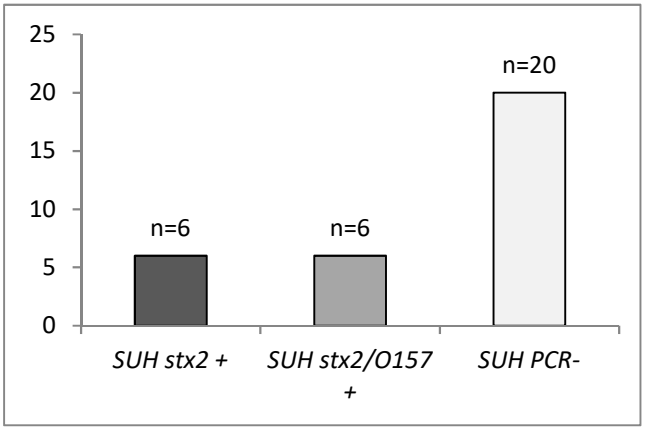


Figura 1A: Diagnóstico fecal por PCR en pacientes con SUH.
Las PCR se realizaron sobre ADN extraído de la zona de confluencia de crecimiento bacteriano, según lo descripto en Materiales y Métodos. Número de muestras que resultaron positivas para: *stx2 / rfbO157* (STEC O157); *stx2* (STEC no O157) o no se detectó ningún gen (negativas

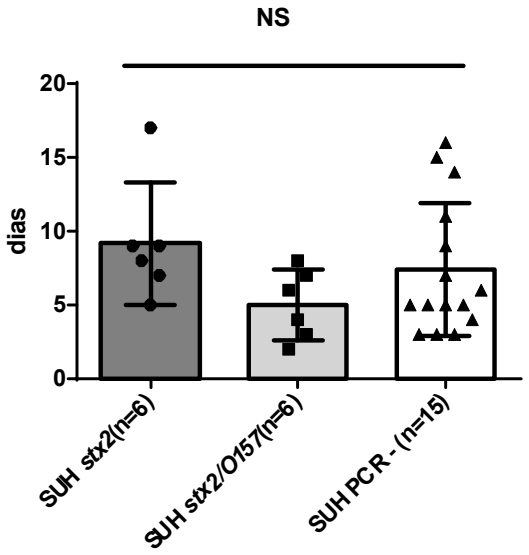


Figura 1 B. Tiempo transcurrido entre el inicio de la enfermedad y la recogida de la muestra, según genotipificación por PCR

Tiempo de excreción.

La duración de la eliminación de STEC O157 y no-O157 se definió como el intervalo entre el inicio de la diarrea y la última muestra positiva, seguida de dos cultivos negativos consecutivos obtenidos con al menos 48 horas de diferencia. La mediana (rango) de tiempo de excreción para los casos de STEC no-O157 fue de 8,5 (7-17) días y para los casos de STEC O157 fue de 6 (2-8) días, lo que resulta en una diferencia estadísticamente diferente (Figura 1C).

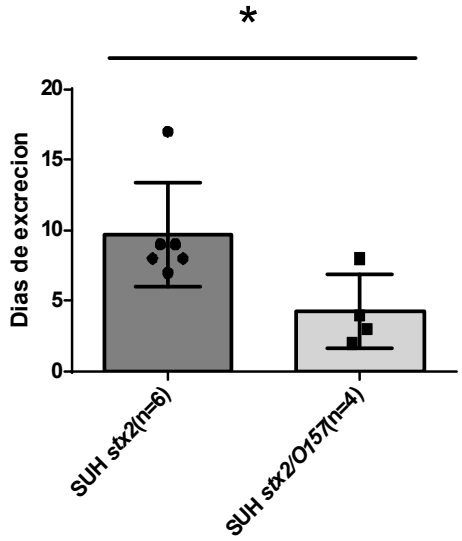


Figura 1C. El tiempo de excreción se definió y calculó como días entre el inicio de la diarrea y la última muestra positiva. * p <0,05 según la prueba de Mann-Whitney

Diagnóstico serológico en pacientes con SUH.

Como método diagnóstico complementario, se realizaron pruebas serológicas para detectar anti-LPS O157, O145 y O121, anticuerpos IgM / IgG utilizando GlycoiELISA (CHEMLIS®) en 27 pacientes con SUH. No se dispuso de cinco muestras de suero.

Analizamos la frecuencia de anticuerpos según el serotipo LPS. La mayoría de las muestras de suero (n = 18) resultaron positivas para anticuerpos anti-LPS O157 (66,7%), todas correspondientes a los isotipos IgM e IgG, excepto una que solo presentó anticuerpos pertenecientes a la clase IgM. Los siguientes anticuerpos detectados con mayor abundancia fueron anti-LPS O145 (n = 6, 22,2%), todos ellos pertenecientes a los

isotipos IgM e IgG. Ninguno de los sueros analizados presentó anticuerpos anti-LPS O121 y tres muestras resultaron negativas para los tres serotipos de LPS (11,1%) (Figura 2A). Entre los pacientes con PCR negativa, la prueba serológica detectó anticuerpos anti-LPS contra los siguientes serotipos: 12 LPS O157, 4 LPS O145 y 1 negativo para los tres serotipos LPS (Figura 2B). Cuando comparamos los resultados de PCR y los serológicos de los pacientes, encontramos que todos los pacientes diagnosticados positivos para el genotipo *stx2 / rfbO157* por PCR (n = 5) presentaban anticuerpos anti-LPSO157 (Figura 2C), que pertenecían a los isotipos IgM e IgG, excepto uno que presentaba solo el isotipo IgM. Así, la prueba serológica confirmó el resultado de la PCR y la infección por STEC O157 como se puede observar en la Figura 2C. Por otro lado, encontramos que 2 de los 5 pacientes con SUH asociados a infecciones por STEC no-O157 (PCR positivos solo para *stx2*), fueron positivos para anticuerpos anti-LPSO145 y 1 de los 5 fue positivo para anti-LPS O157. Todos estos anticuerpos correspondieron a los isotipos IgM e IgG. Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que dos infecciones distintas de O157 probablemente se asociaron con cepas O145, pero un resultado no fue coincidente, porque el ensayo serológico detectó anticuerpos anti-LPS O157, pero por PCR solo el gen *stx2*. Dos pacientes dieron negativo para los tres serotipos de LPS estudiados y no fue posible determinar la cepa específica de STEC involucrada en estos casos de SUH.

A

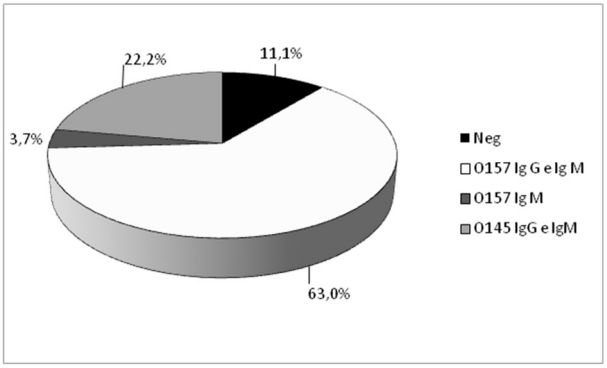


Figura 2: Diagnóstico serológico en pacientes con SUH. Se estudió la presencia de anticuerpos IgM / IgG anti-LPS O157, O145 y O121 en sueros de 27 pacientes con SUH mediante GlycoiELISA.
A. Frecuencia de muestras positivas para cada serotipo de LPS.

B

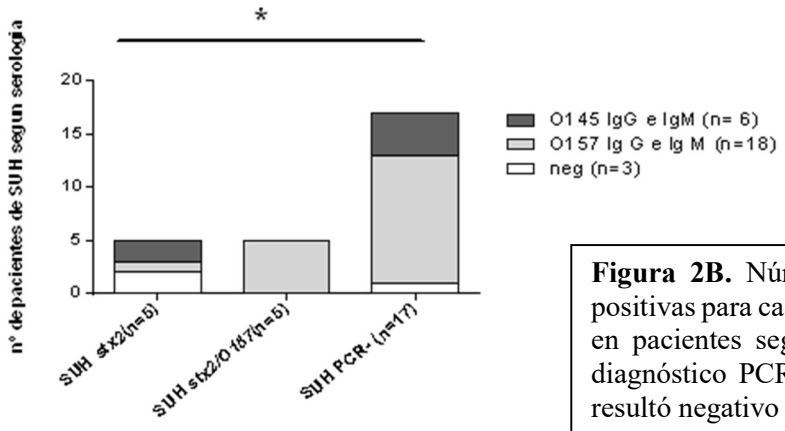


Figura 2B. Número de muestras positivas para cada serotipo de LPS en pacientes segregados según el diagnóstico PCR en materia fecal resultó negativo o positivo.

Posteriormente, analizamos la correlación entre los resultados obtenidos mediante PCR en heces y estudios serológicos. Ocho de los 27 pacientes con SUH estudiados mediante los 2 métodos fueron positivos para STEC por ambos métodos (29,6%), 2 fueron positivos para STEC solo por PCR (stx2 7,4%), 16 fueron positivos solo por estudios serológicos (59,2%) y 1 paciente fue negativo por ambos métodos (3,7%) (Figura 3). Por lo tanto, la combinación de ambos métodos de diagnóstico mejoró el diagnóstico de SUH y permitió aumentar la identificación de SUH asociado a STEC del 37,3% (10 pacientes con SUH confirmaron la asociación de STEC solo por PCR) al 96,3% cuando ambos métodos fueron combinados (26 pacientes con SUH confirmaron la asociación con STEC con al menos un resultado positivo). Por otro lado, el serotipo STEC más prevalente fue el O157. En efecto, el 66,7% de muestras positivas por determinación de anti-LPS y el 18,5% por análisis de PCR fueron positivas para O157. Este resultado confirma la alta circulación de esta cepa bacteriana en el país, lo cual también fue reportado por estudios epidemiológicos.

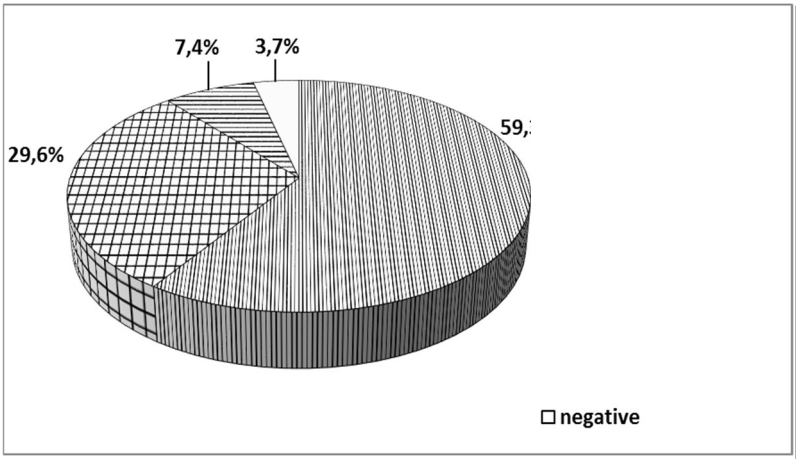


Figura 3: Diagnóstico serológico versus resultado de PCR en pacientes con SUH. Frecuencia de pacientes con SUH que presentaron asociación con infección por STEC según el método diagnóstico utilizado. Positivo por ambos métodos (fracción cuadriculada), solo por PCR (fracción con líneas horizontales), solo por serología (fracción con líneas verticales) o negativo por ambos métodos (fracción blanca).

Severidad según serotipo STEC.

Los pacientes con SUH fueron clasificados según el serotipo de infección por STEC (O157 frente a no-O157) y se compararon los parámetros clínicos y bioquímicos en el momento de la internación. No se observaron diferencias estadísticas entre ambos grupos a excepción del hematocrito (Tabla 2). Efectivamente, los pacientes con SUH secundario a infecciones por STEC O157, mostraron un hematocrito significativamente menor que los asociados a STEC no-O157 ($p < 0,001$, prueba de Mann-Withney). Además, no se observó asociación entre el serotipo y la gravedad del resultado renal (SUH I, II o III) (prueba de Spearman).

Tabla 2: Parámetros clínicos y de laboratorio expresados en rango y mediana de pacientes con SUH, agrupados según se hayan asociado a infecciones con STEC O-157 o STEC no O157. Los valores de p se obtuvieron mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Datos clínicos/ laboratorio	Pacientes SUH serotipo STEC no-O157 (n=10)	Pacientes SUH serotipo STEC O157 (n=17)	P value
Edad (meses)	36 (10-60)	24 (9-36)	
Sexo (ratio niñas/niños)	2	1.8	
Duración de la diarrea (días)	6 (3-10)	4 (3-11)	0,4407
Días de anuria	2 (0-10)	7 (0-14)	0,4452
Días de diálisis	4 (0-13)	7 (0-17)	0,1829
Leucocitos totales $x10^3$/ul	10,5 (3,8-26)	18,1 (2,8-54,8)	0,1741
Plaquetas $x10^3$/ul	48 (19-522)	44 (10-150)	0,7021
Urea (mmol/L)	26,8 (1,5-55,3)	27 (15,1-46,3)	0,466
Ácido Úrico (umol/L)	773,3 (101,1-945,8)	737,6 (577-951,8)	0,7407
Creatinina (umol/L)	256,4 (22,1-848,6)	282,9 (97,2-450,8)	0,8148
Neutrófilos $x10^3$/ul	9,9 (2-21,7)	9 (3,6-38,4)	0,9692
Hematocrito (%)	30 (22-33)	25 (19-29)	0.0008 (***)
N° de transfusiones	2 (1-5)	2 (1-10)	0,6758

Diagnóstico fecal por PCR en familiares de pacientes con SUH.

Las muestras de heces de 93 familiares correspondientes a 23 niños con SUH estuvieron disponibles durante la primera semana del diagnóstico de SUH. El número de familiares estudiados por paciente osciló entre 1 y 9 (mediana = 4). La mayoría de los familiares estudiados fueron padres (n = 39), hermanos (n = 26), abuelos (n = 7), tíos (n = 9) y primos (n = 12). Solo 8 de las 93 muestras estudiadas fueron positivas por PCR (PCR +)

(8,6%). Seis de 23 pacientes con SUH tenían 1 familiar con PCR + y 1 paciente con SUH 2 familiares con PCR +, resultando que 7 pacientes con SUH tenían al menos un familiar con PCR + (30,4%). Cuando analizamos la relación entre los 7 pacientes y 8 PCR + familiares encontramos 2 madres, 2 padres, 1 abuela y 3 hermanos, de 4, 12 y 14 años.
Los 93 familiares estudiados se clasificaron en función de si eran familiares de pacientes con HUS PCR + (n = 8) o HUS PCR negativo (PCR -) (n = 15). Veintiocho familiares pertenecían al grupo HUS PCR + y 65 familiares al grupo HUS PCR-. En el primer grupo (8 pacientes con HUS PCR +), 6 de los familiares evaluados fueron positivos para algún genotipo de STEC (21,4%) (Figura 4A). Mientras que en el segundo grupo (15 pacientes con HUS PCR-) solo 2 de los 65 familiares evaluados fueron positivos para algún genotipo de STEC (3,1%). Así, encontramos una frecuencia estadísticamente mayor de detección de STEC entre familiares de pacientes con SUH que tenían PCR + que entre familiares de pacientes que tenían PCR-.

Se analizó la asociación entre el resultado de la determinación del genotipo por PCR entre familiares y pacientes. Los resultados se muestran en la Figura 4B. Seis de los 8 contactos resultaron PCR + para el gen *stx2* (cepa STEC no-O157) y solo 2 mostraron el genotipo *stx2 / rfbO157*, independientemente del genotipo STEC detectado en el paciente. Por tanto, parece más frecuente la detección de cepas STEC no-O157 que O157 entre familiares asintomáticos.

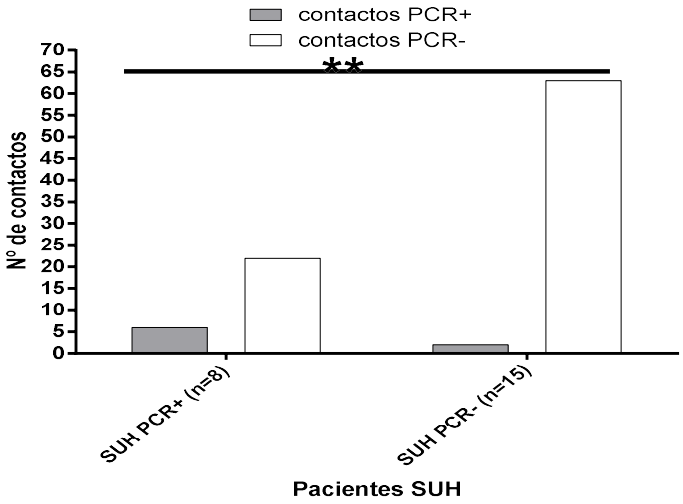


Figura 4. Diagnóstico fecal por PCR en familiares de pacientes con SUH. Se analizaron muestras fecales de 93 familiares para la detección de STEC mediante PCR.
A) Los resultados de los familiares se representan como PCR negativos (barras blancas) o positivos (barras gris) y segregados de acuerdo con el resultado de PCR del paciente con SUH (positivo (+) o negativo (-)). ** p <0,005 por el test de Chi cuadrado.

B

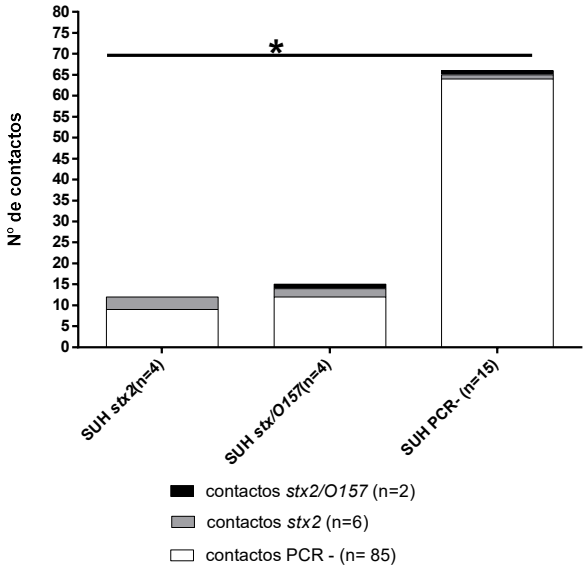


Figura 4B. Número total de contactos estudiados (93) distribuidos en las barras según el resultado de PCR del paciente con SUH del cual son contactos *stx2*/*rfbO157* (STEC O157) o *stx2* (STEC no O157) (eje x), y discriminados en franjas dentro de cada barra según la señal de PCR de su materia fecal (eje y) (n pacientes total: 23; n contactos total: 93). Chi-cuadrado Pearson Infostat P value de 0.0134

DISCUSIÓN

Un diagnóstico etiológico precoz y preciso durante la presentación de PTT/SUH es muy importante porque definirá el tratamiento y la evolución final del cuadro [12]. Aunque Argentina tiene una incidencia extraordinariamente alta de SUH típico, el diagnóstico de infección por STEC es fundamental para descartar un SUH atípico. El diagnóstico fecal es el método de referencia para diagnosticar el SUH asociado a STEC [13]. Además, el aislamiento de una colonia de STEC de las heces permite la caracterización completa de la cepa involucrada en el caso de SUH, así como la identificación de un brote y conocer la situación epidemiológica en la región. Sin embargo, este método tiene algunos inconvenientes, los más importantes están asociados a las características inherentes de la bacteria, su fase de colonización transitoria, el hecho de que inóculos bajos son suficientes para inducir la enfermedad y el curso natural de la enfermedad. Aunque hace mucho tiempo que se ha informado de la detección temprana de anticuerpos anti-LPS en el SUH típico [14-16], sólo recientemente se han desarrollado pruebas serológicas específicas basadas en la detección de estos anticuerpos. Al respecto, Melli et al. fueron los primeros en publicar sus hallazgos sobre un nuevo ensayo de glico-iELISA que utiliza glicoproteínas de ingeniería bacteriana para los serotipos O157, O145 y O121 [17]. Estos autores, demostraron que el glico-iELISA era altamente sensible, específico y no se encontró reactividad cruzada entre diferentes serotipos de STEC (resp. O111, O103, O45, O26, O104) y otras bacterias gran-negativas (*Salmonella, Brucella abortus, Yersinia enterocolitica*) [18]. Desde entonces, se ha sugerido que el diagnóstico serológico agrega valor al diagnóstico fecal. Además, la alta sensibilidad (100%) y la utilidad clínica del glico-iELISA también se demostró recientemente en una cohorte de pacientes pediátricos con SUH de los Países Bajos [19,20].

Nuestros resultados mostraron un bajo porcentaje de pacientes STEC positivos por PCR (37,3%) frente a los positivos por serología (88,9%). Además, de acuerdo con informes anteriores, encontramos una fuerte asociación entre ambos métodos (genotipificación y serología) y pudimos identificar el 96,3% de los casos de SUH como secundarios a infecciones por STEC, cuando se utilizaron ambos métodos. Aunque la serología no reemplazó al diagnóstico fecal, debe utilizarse para complementar el diagnóstico

microbiano. Apoyamos que la prueba serológica es útil principalmente para pacientes pediátricos con SUH, porque las personas jóvenes o adultas que están expuestas regularmente a cepas enterohemorrágicas de E. coli, como las que se encuentran en regiones endémicas para estos patógenos, o el personal que trabaja con animales de granja, pueden portar anticuerpos séricos contra Antígenos LPS de STEC, dificultando la interpretación de la serologia [21, 22].

El rango de edad y la proporción de sexo masculino: femenino en esta cohorte fue similar a lo informado en otro estudio de la región sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina, publicado recientemente por Alconcher et al [23]. Cuando se clasificó retrospectivamente a los pacientes según la gravedad renal considerando los días de anuria (tabla 1), el único parámetro que podría considerarse un indicador de mala evolución renal, además de los parámetros de función renal, fue la concentración de hemoglobina. En consonancia con esta observación, se informó anteriormente que los valores elevados de hemoglobina y la hiponatremia eran predictores independientes de la gravedad, asociados principalmente a la afectación del sistema nervioso central [24].

Además, nuestro objetivo fue evaluar a los familiares porque el diagnóstico precoz de las infecciones por STEC es muy importante para detectar brotes intrafamiliares y / o cortar la cadena de transmisión y prevenir infecciones nuevas o secundarias, principalmente en niños en edad de riesgo. De hecho, se ha demostrado que los niños pequeños tienen más probabilidades de transmitir y ser infectados por los contactos domésticos [25]. En nuestro estudio, el 30,4% de los pacientes tenían al menos un positivo relativo para STEC, similar al hallazgo del informe de Alconcher, en el que el 36,6% de los pacientes con SUH tenían al menos un contacto familiar positivo [23]. Previamente, Zotta et al, encontraron un 16,0% de portadores asintomáticos de STEC entre los contactos domiciliarios de los casos de SUH en Argentina [26], lo que sugiere la mejora en las técnicas de diagnóstico en los últimos años.

Encontramos una frecuencia estadísticamente mayor de detección de STEC en familiares de pacientes con SUH con resultado positivo en la PCR que en los pacientes con SUH con resultado negativo en la PCR. Estos datos sugieren que cuando el paciente tenía una carga bacteriana lo suficientemente alta como para ser detectada por PCR, también se detectaron cepas de STEC en las muestras fecales de familiares, dando cuenta de la circulación domiciliaria de cepas patógenas (brotes intrafamiliares). Además, los pacientes y familiares suelen ser portadores de la misma cepa, lo que da fuerza a la idea de circulación de cepas patógenas en el hogar. Aunque en Europa se ha sugerido que la transmisión de persona a persona, también llamada transmisión secundaria, da cuenta de un pequeño número de todas las infecciones por STEC (aproximadamente el 15%) [27,28], en Argentina, donde las infecciones por STEC tienen un claro comportamiento endémico, se espera que este porcentaje sea significativamente mayor. Para ello, los programas educativos y las medidas de control preventivas son de destacada importancia en Argentina. En línea con esta conclusión, una encuesta sobre medidas preventivas para la transmisión secundaria de STEC, realizada en 2016 entre los estados miembros de la Unión Europea reveló que todos los países participantes (14/32) centraron sus esfuerzos en grupos de personas infectadas con mayor probabilidad de transmitir STEC, por ejemplo manipulador de alimentos, o niños menores de 5 años que asisten al jardín de infancia [28,29]. Además, recomendaron sólo el seguimiento de los casos de infecciones con STEC de alta virulencia (determinada por información microbiológica y clínica). La situación en Argentina es preocupante debido a la alta circulación de STEC de alta virulencia (es decir, perteneciente al clado 8), y porque su detección durante la fase prodrómica de la diarrea no es eficiente [30].

En Japón, la transmisión doméstica secundaria más alta se demostró en hermanos menores de 9 años [31]. En este informe, la educación en higiene de los niños y el personal de los centros de atención se señala como una de las medidas más efectivas para prevenir la transmisión secundaria en el hogar en los brotes de STEC. Werber D et al propusieron separar rápidamente a los pacientes pediátricos con infección por STEC O157 de sus hermanos pequeños para evitar casos secundarios, especialmente frecuentes entre hermanos menores de 5 años [32,33]. Debe tenerse en cuenta que los niños infectados por *E. coli* O157:H7 excretan entre 10.000.000 y 100.000.000 de patógenos por gramo de heces al principio durante el curso de su enfermedad [34]. Además, no solo la virulencia de los patógenos que circulan dentro de la misma especie animal por transmisión horizontal se retiene, sino que podría aumentar. En este sentido, demostramos previamente que una cepa de *E. coli* O157 es más infecciosa para los ratones después del paso a través del intestino del ratón que la cepa parental aislada de un paciente humano [35]. Encontramos casi 100 genes expresados diferencialmente en la cepa adaptada en comparación con la parental. En particular, detectamos una sobreexpresión del sistema de secreción de tipo tres (SSTT) y FliC, tanto en los niveles de ARNm, como en la concentración proteica, que se correlacionó con aumento de la adhesión a las líneas de células epiteliales y aumento de la motilidad de la cepa adaptada [36].

Afortunadamente, *E. coli* O157:H7 persiste solo temporalmente en el intestino humano. Encontramos que luego del diagnóstico de SUH, el tiempo de detección de O157: H7 en las heces es bajo y significativamente menor que las cepas no-O157 (6 frente a 8,5 días, respectivamente). Esto probablemente refleja el umbral técnico de detección y significa que la concentración bacteriana cae rápidamente varios logaritmos en un tiempo relativamente corto. De todos modos, en base a la baja dosis infecciosa de las cepas de STEC, en Argentina los niños infectados por STEC y recuperados, pueden regresar al jardín de infantes o guardería solo después de dos estudios consecutivos de materia fecal con un resultado de PCR negativo.

Entre los patógenos de STEC, *E. coli* O157:H7 es singularmente virulenta. Por tanto, no es sorprendente que este serotipo haya sido la cepa prevalente entre los pacientes con SUH de nuestra cohorte. De acuerdo con la virulencia de *E. coli* O157:H7, Espié y colaboradores también informaron que el 66% de los pacientes con SUH, fueron asociados a infecciones por STEC y el serogrupo O157 fue el más comúnmente identificado (83%) en Francia durante el período 1996-2006 [37]. Sin embargo, la red FoodNet informó un aumento en la incidencia de infecciones entéricas causadas por STEC no-O157 durante 2000-2010, aunque estas infecciones se asociaron menos con brotes que las O157 (7% versus 20%, respectivamente) [38].

La prevalencia del serotipo STEC O157 en nuestra cohorte pediátrica confirmó la alta circulación de esta cepa bacteriana en el país, lo que también fue informado previamente por estudios epidemiológicos [3-6]. Cuando se analizaron los datos clínicos y bioquímicos de los pacientes con SUH teniendo en cuenta el serotipo bacteriano asociado (tabla 2), no se encontraron diferencias estadísticas en ninguno de los parámetros analizados excepto en el hematocrito, que fue significativamente mayor en los pacientes de SUH asociados a infecciones con *E. coli* no-O157 que en los asociados con infecciones STEC O157. Aunque se ha informado anteriormente que el hematocrito alto está asociado con la afectación neurológica y la gravedad, estos autores no encontraron asociación entre un serotipo de STEC específico o un genotipo de stx identificado con la gravedad [39]. Por lo tanto, el impacto diferencial de la infección por STEC O157 frente a la infección por STEC no O157 en el valor del hematocrito en el diagnóstico de SUH requiere una evaluación adicional.

En resumen, es de suma importancia realizar el diagnóstico microbiológico junto con el serológico en el momento del diagnóstico clínico de SUH, así como realizar una encuesta exhaustiva de contactos cercanos para buscar portadores asintomáticos u otros niños en edad de riesgo para SUH. Un diagnóstico certero y rápido, junto con medidas de prevención de la transmisión horizontal, pueden ayudar a reducir los casos de SUH en Argentina.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece especialmente a los médicos nefrólogos pediátricos Adriana Santiago y Ramón Exeni del Departamento Nefrología, Hospital de Niños "Prof. Dr. RA Exeni", San Justo, Provincia de Buenos Aires, a cargo del diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes y sus familiares; y a las Dras. Isabel Chinen y Elizabeth Milliwebsky del Servicio Fisiopatogenia, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, CABA, por la evaluación de los sueros de pacientes con SUH por el método de Glico-ELISA.

REFERENCIAS

1. Sheerin NS, Glover E. Haemolytic uremic syndrome: diagnosis and management. Review. F1000Res. 2019 Sep 25;8:F1000 Faculty Rev-1690.
2. Bommer M, Wölfle-Guter M, Bohl S, Kuchenbauer F. The Differential Diagnosis and Treatment of Thrombotic Microangiopathies. Review. Dtsch Arztebl Int 2018; 115: 327–34.
3. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA. The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission. Medicina (B Aires) 2006; 66(Suppl 3):S27–S32.
4. Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Masana M. Risk Factors for Shiga Toxin-Producing Escherichia coli-Associated Human Diseases. Review. Microbiol Spectr. 2014;2(5).
5. http://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n560-se-302021
6. Pianciola L, Rivas M. Genotypic Features of Clinical and Bovine Escherichia coli O157 Strains Isolated in Countries with Different Associated-Disease Incidences. Microorganisms. 2018;6(2):36.
7. K. Haugum, L. T. Brandal, B.A. Lindstedt, A. L. Wester, K. Bergh and J. E. Afset. PCR-Based Detection and Molecular Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Strains in a Routine Microbiology Laboratory over 16 years. J Clin Microbiol. 2014; 52(9): 3156–3163.
8. JB Ludwig, Xiaorong Shi, PB. Shridhar, EL Roberts, C DebRoy, RK Phebus, J Bai, and T. G. Nagaraja. Multiplex PCR Assays for the Detection of One Hundred and Thirty Seven Serogroups of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Associated With Cattle. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10: 378.

9. Costin M, Cinteza E, Balgradean M. Hemolytic Uremic Syndrome - Case report. Maedica (Buchar). 2019;14(3):298-300

10. Gianantonio C, Vitacco M, Mendilaharzu F, Gallo G, Sojo E.The hemolytic-uremic syndrome. Nephron 1973;11:174–192

11. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validation of a multiplex PCR for detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli].Rev Argent Microbiol. 2005;37:1-10.

12. Zini G, De Cristofaro R. Diagnostic Testing for Differential Diagnosis in Thrombotic Microangiopathies. Turk J Haematol. 2019;36(4):222-229

13. Webster K, Schnitzler E. Hemolytic uremic syndrome. Handb Clin Neurol. 2014;120:1113-23.

14. Bitzan M, Moebius E, Ludwig K, Muller-Wiefel DE, Heesemann J, et al. High incidence of serum antibodies to Escherichia coli O157 lipopolysaccharide in children with hemolytic-uremic syndrome. J Pediatr 1991;119: 380–385.

15. Greatorex JS, Thorne GM. Humoral immune responses to Shiga-like toxins and Escherichia coli O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. J Clin Microbiol 1994;32:1172–1178.

16. Ludwig K, Bitzan M, Bobrowski C, Muller-Wiefel DE .Escherichia coli O157 fails to induce a long-lasting lipopolysaccharide-specific, measurable humoral immune response in children with hemolytic-uremic syndrome. J Infect Dis 186:566–569(2002).https://doi.org/10.1086/341781

17. Melli LJ, Ciocchini AE, Caillava AJ, Vozza N, Chinen I, Rivas M, Feldman MF, Ugalde JE, Comerci DJ. Serogroup-specific bacterial engineered glycoproteins as novel antigenic targets for diagnosis of Shiga toxin-producing-*Escherichia coli*-associated hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol 2015;53:528–538.

18. Castillo DS, Rey Serantes DA, Melli LJ, Ciocchini AE, Ugalde JE, Comerci DJ, Cassola A. A recombinant O-polysaccharideprotein conjugate approach to develop highly specific monoclonal antibodies to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O145 serogroups. PLoS One 2017;12:e0182452. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182452

19. Wijnsma KL, van Bommel SA, van der Velden T, Volokhina E, Schreuder MF, van den Heuvel LP, van de Kar NC. Fecal diagnostics in combination with serology: best test to establish STEC-HUS. Pediatr Nephrol. 2016;31:2163-70.

20. Wijnsma KL, Veissi ST, van Bommel SAM, Heuver R, Volokhina EB, Comerci DJ, Ugalde JE, van de Kar NCAJ, van den Heuvel LPWJ. Glyco-iELISA: a highly sensitive and unambiguous serological method to diagnose STEC-HUS caused by serotype O157. Pediatr Nephrol. 2019;34:631-639.

21. Evans J, Chalmers RM, Chart H, Salmon RL, Kench SM, Coleman TJ, Meadows D, Morgan-Capner P, Softley P, Sillis M, Thomas DR. Evidence of persisting serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide and Verocytotoxin in members of rural communities in England. Eur J Epidemiol 2000;16:885–889

22. Chart H, Cheasty T. Human infections with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157—10 years of E. coli O157 serodiagnosis. J Med Microbiol 2008;57:1389 –1393.

23. Alconcher LF, Rivas M, Lucarelli LI, Galavotti J, Rizzo M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in household members of children with hemolytic uremic syndrome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020;39:427-432.

24. Alconcher LF, Coccia PA, Suarez ADC, Monteverde ML, Perez Y Gutiérrez MG, Carlopio PM, Missoni ML, Balestracci A, Principi I, Ramírez FB, Estrella P, Micelli S, Leroy DC, Quijada NE, Seminara C, Giordano MI, Hidalgo Solís SB, Saurit M, Caminitti A, Arias A, Rivas M, Risso P, Liern M. Hyponatremia: a new predictor of mortality in patients with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* hemolytic uremic syndrome. Pediatr Nephrol. 2018;33:1791-1798.

25. Snedeker KG, Shaw DJ, Locking ME, and Prescott RJ. Primary and secondary cases in *Escherichia coli* O157 outbreaks: a statistical analysis. BMC Infectious Diseases 2009;9, 144.

26. Zotta CM, Chinen I, Lavayén S, Cepeda M, Deza N, Morvay L, Carbonari C, Rearte A, Rivas M. *Escherichia coli* in household contacts of cases of hemolytic uremic syndrome. Salud y Ciencia 2015;21:136–141

27. Werber D, Scheutz F. The importance of integrating genetic strain information for managing cases of Shiga toxin-producing *E. coli* infection. Epidemiology and Infection 2019;147, e264, 1–3.

28. Kintz E, Brainard J, Hooper L and Hunter P. Transmission pathways for sporadic Shiga-toxin producing *E. coli* infections: a systematic review and meta-analysis. International Journal of Hygiene and Environmental Health 2017;220, 57–67.

29. Veneti L, Lange H, Brandal L, Danis K and Vold L. Mapping of control measures to prevent secondary transmission of STEC infections in Europe during 2016 and revision of the national guidelines in Norway. Epidemiology and Infection, 2019;147, e267.

30. Pianciola L, Chinen I, Mazzeo M, Miliwebsky E, González G, Müller C, Carbonari C, Navello M, Zitta E, Rivas M. Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains that cause diarrhea and hemolytic uremic syndrome in Neuquén, Argentina. Int J Med Microbiol. 2014;304(3-4):499-504.

31. Tokuda K, Yahata Y, Sunagawa T. Prevention of secondary household transmission during Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks. Epidemiol. Infect. 2016;144:2931–2939 J Med Microbiol. 2012 Apr;61(Pt 4):552-558. doi: 10.1099/jmm.0.039289-0. Epub 2011 Dec 1.

32. Werber D, Mason BW, Evans MR, Salmon RL. Preventing household transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection: promptly separating siblings might be the key. Clin Infect Dis. 2008;46:1189-96.

33. Ahn C K, Klein E, Tarr PI.. Isolation of patients acutely infected with *Escherichia coli* O157:H7: low-tech, highly effective prevention of hemolytic uremic syndrome. Clin Infect Dis 2008;46:1197-9.

34. Cornick NA, Jelacic S, Ciol MA, Tarr PI. *Escherichia coli* O157:H7 infections: discordance between filterable fecal shiga toxin and disease outcome. J Infect Dis 2002; 186:57–63.

35. Fernandez-Brando, R.J., Miliwebsky, E., Mejias, M.P., Baschkier, A., Panek, C.A., Abrey-Recalde, M.J. et al. Shiga toxin-producing Escherichia coli O157: H7 shows

an increased pathogenicity in mice after the passage through the gastrointestinal tract of the same host. J. Med. Microbiol. 2012;61,852–859.

36. Fernandez-Brando RJ, McAteer SP, Montañez-Culma J, Cortés-Araya Y, Tree J, Bernal A, Fuentes F, Fitzgerald S, Pineda GE, Ramos MV, Gally DL, Palermo MS. Mechanisms involved in the adaptation of Escherichia coli O157:H7 to the host intestinal microenvironment. Clin Sci (Lond). 2020;134:3283-3301.

37. Espié E, Grimont F, Mariani-Kurkdjian P,y col. Surveillance of hemolytic uremic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996-2006. Pediatr Infect Dis J 2008;27:595-601.

38. Gould LH, Mody RK, Ong KL, y col; Emerging Infections Program Foodnet Working Group.Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with E. coli O157 infections. Foodborne Pathog Dis. 2013;10:453-60.

39. Alconcher LF, Balestracci A, Coccia PA,y col. Hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin-producing Escherichia coli infection in Argentina: update of serotypes and genotypes and their relationship with severity of the disease. Pediatr Nephrol. 2021 Feb 18. doi: 10.1007/s00467-021-04988-y.

ABSTRACT

Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) is a thrombotic microangiopathy (TMA) characterized by endothelial dysfunction and the formation of platelet- and fibrin-rich thrombi in small blood vessels. Microangiopathy can cause secondary platelet consumption and mechanical disturbance of erythrocytes, leading to the typical hematological manifestations of TMA: thrombocytopenia and microangiopathic hemolytic anemia (formation of schistocytes, increased lactate dehydrogenase enzyme, and decreased haptoglobin).

HUS-compatible clinical disease can occur in a wide range of clinical settings. Most cases (90%) occur after infection with a Shiga toxin-producing bacteria, usually enterohemorrhagic *Escherichia coli* (STEC), are called typical HUS, and generally affect children. The remaining 10% of cases have traditionally been grouped as atypical HUS. The variability in the clinical characteristics of the patients at early stages of disease makes it necessary to complement the clinical diagnosis in order to know the etiology of TMA. In fact, prompt diagnosis allows establish the correct treatment and treatment can save lives.

The objective was to improve the etiological diagnosis of HUS cases based on the identification of STEC strains, by PCR techniques from fecal matter. In parallel, we analyzed the contribution of anti-Lipopolysaccharide (anti-LPS) antibodies in serum to confirm the cases as typical HUS. In addition, we studied the relatives of patients to detect circulating pathogenic strains that could contribute to the diagnosis of HUS in patiens, in cases where it was not possible to isolate or detect STEC and / or prevent the spread of pathogenic strains, in families or in the community. This study describes the diagnosis of 32 patients with HUS treated at the Hospital de Niños “Prof Dr RA Exeni” de San Justo, Province of Buenos Aires and the analysis of 93 family members.

ESTUDIO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE RETINOBLASTOMA Y ASESORAMIENTO GENÉTICO

Diana Lidia Parma

Laboratorio de Neurobiología Molecular, Cátedra de Genética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas José de San Martín - UBA. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo. INIGEM - UBA - CONICET

INTRODUCCIÓN

El Retinoblastoma (Rb) es el cáncer ocular más frecuente en niños, con una incidencia de aproximadamente 1 en 20.000 nacidos vivos. El desarrollo de Rb comienza con la inactivación del gen de susceptibilidad a tumores o gen supresor tumoral *RB1*. Este gen tiene 27 exones. El Rb bilateral (40% de casos) es causado por una mutación constitucional en una copia del gen, que puede ser heredada (10% de los casos) o aparecer de novo. Esto es seguido por una mutación somática en la otra copia del gen, lo cual lleva a una pérdida de función de la proteína y la iniciación del tumor. El Rb unilateral ocurre en un 60% de casos y la mayoría de ellos tiene solo mutaciones somáticas en ambas copias del gen, por lo cual el Rb no es hereditario. Sin embargo, una minoría (aproximadamente 15-20%) lleva una mutación germinal dando lugar a la forma hereditaria. Clínicamente, es importante determinar si el paciente unilateral tiene una mutación germinal e identificar la mutación causante de Rb en los casos hereditarios, para detectar niños presintomáticos en la familia, permitiendo un diagnóstico temprano y tratamiento. Por otro lado, la demostración de la ausencia de mutación en los miembros de la familia reduce los procedimientos clínicos para detectar el tumor que podrían tener una potencial morbilidad. El análisis genético molecular de pacientes con Rb identifica niños con la forma hereditaria (aproximadamente 50%) que tienen predisposición para un segundo tumor. Más aún, los niños con tumor unilateral hereditario tienen el riesgo de bilateralización, desarrollo de tumor en el ojo que estaba sano. Por otro lado, la demostración de la presencia de mutaciones en el ADN de tumor y su ausencia en la sangre permite asegurar que el carácter de retinoblastoma es no hereditario, lo cual es útil para el asesoramiento genético a la familia.

El alto porcentaje de supervivencia en países desarrollados (90-95%) contrasta con el pronóstico desfavorable para Rb en países en desarrollo, donde vive la mayoría de los pacientes con Rb. En nuestro país, el Hospital Garrahan recibe unos 40 nuevos pacientes por año, pero probablemente hay más niños con Rb que viven en la pobreza sin recibir tratamiento médico. El grado de supervivencia de los pacientes tratados es alrededor de 80% con un seguimiento que continúa en la adultez.

La detección temprana del cáncer es fundamental para la supervivencia y para la preservación del órgano afectado, que en este caso es el de la visión. Dado que el Rb es hereditario en un 50% de los casos, es necesario analizar a los familiares del paciente para detectar aquellos que posean la predisposición al desarrollo del tumor antes de que éste aparezca. Esto es posible de llevar a cabo conociendo la alteración genética que da origen al tumor en cada paciente.

Por todo lo anteriormente mencionado, el objetivo principal del proyecto fue alcanzar el diagnóstico genético molecular a un número mayor de pacientes, determinar el estándar de cuidado apropiado para cada uno y brindar asesoramiento genético a las familias afectadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes:

Se analizaron pacientes con diagnóstico clínico de Rb y/o miembros de familias afectadas con dicha patología, derivados de distintos servicios de Oftalmología y Genética de Instituciones Públicas. Se les informó acerca de los estudios a realizarse y se procedió a la apertura de una historia clínica.

Muestras:

Se obtuvo ADNg de leucocitos de sangre periférica, por el método de CTAB, y de tumores congelados, por el tratamiento con proteinasa K, purificación con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. La calidad del ADNg se determinó mediante geles de agarosa al 1% y los cocientes A260nm/A280nm y A260nm/A230nm.

Búsqueda de pequeñas alteraciones moleculares:

Para la identificación de mutaciones pequeñas en el gen RB1 (mutaciones puntuales y deleciones/inserciones de corta longitud), se implementó la Secuenciación del Exoma Completo (WES) [Servicio de Macrogen]. Se utilizó el método de captura por hibridación Agilent SureSelect V5 Target Enrichment Kit y el equipo Illumina Novaseq. El archivo resultante (FASTQ) se alineó en base al Genoma Humano de Referencia GRCh37 del NCBI implementando la herramienta informática BWA. Para la identificación, anotación y filtrado de las variantes de secuencia, se aplicaron los programas y bases de datos: Picard, Genome Analysis Toolkit (GATK), SnpEff, dbSNP, 1000Genomes Phase 3, ClinVar y ESP. Finalmente, los archivos BAM se analizaron implementando el software IGV con el objetivo de estudiar la cobertura y la calidad de las lecturas para cada uno de los exones de los genes analizados.

Todas las mutaciones patogénicas fueron corroboradas por secuenciación por Sanger: se utilizaron primers específicos para el locus con la variante para la realización de la PCR; los fragmentos se resolvieron en geles de agarosa 2%; los productos de amplificación se secuenciaron [Servicio de Macrogen] con primer forward y primer reverse. La calidad de la secuencia se analizó implementando el software Finchtv. Los resultados se evaluaron por comparación con la secuencia de referencia del gen *RB1*.

Detección de grandes alteraciones moleculares:

Se buscaron grandes deleciones y duplicaciones, incluyendo uno o más exones, empleando el kit comercial de MLPA [MRC Holland (www.mlpa.com)]. Se analizó la correcta amplificación en geles de agarosa al 2%. Los productos se analizarán en un secuenciador automático para fragmentos [Servicio de Macrogen; ABI 3730 XL, Applied Biosystems] con 500Liz como standard interno. El análisis de los datos se llevó a cabo usando los programas GeneMarker y Coffalyser.

Selección de variantes patogénicas:

La patogenicidad de las variantes identificadas se determinó según los siguientes criterios de selección: 1) su frecuencia poblacional en consorcios de secuenciación (ExAC y GnomAD), siendo descartadas aquellas con frecuencia >1%; 2) impacto funcional en regiones codificantes o en la maduración del ARN mensajero; 3) reporte previo en la base de datos de pacientes con Rb como patogénicas; y finalmente, 4) clasificación como Damaging o Probably Damaging por al menos 3 programas predictores del efecto de la mutación (PolyPhen-2, SIFT, CADD, Mutation Taster, Mutation Assessor, UMD-Predictor, ESEfinder y NetGene2).

RESULTADOS

Se analizaron las muestras de sangre de pacientes con Rb para detectar las mutaciones germinales. También se analizaron muestras de tumor (en los casos de disponibilidad de tumor) con el fin de detectar las mutaciones somáticas.

Se estudiaron 17 pacientes, 8 pacientes con presentación de retinoblastoma bilateral y 9 pacientes con presentación unilateral temprana. Tres de los pacientes unilaterales tenían muestra de tumor disponible para analizar, de los otros 14 no tuvimos tumor sino solo sangre. La edad al diagnóstico fue en promedio de 29 meses para los pacientes unilaterales, y 17 meses para los bilaterales. La enucleación fue el tratamiento para la mayoría de los casos y quimioterapia/radioterapia/laser sin enucleación únicamente en 4 casos, algunos pacientes recibieron quimioterapia y enucleación.

Se identificaron las mutaciones en el gen *RB1* en la sangre de 6 pacientes bilaterales (4 de ellos con Rb esporádico) y en 5 pacientes unilaterales con Rb esporádicos. El análisis de las 3 muestras de tumor de pacientes unilaterales reveló mutaciones en las tres.

PAT ID	PHENOTYPE	AGE AT DIAGNOSIS (MONTHS)/ TREATMENT	TISSUE ANALIZED	DETECTION METHOD MUTATION	EXPECTED CONSEQUENCE	RECURRENCE HERITABILITY
709 Son 709 Father	Bilateral Bilateral	7/Chemotherapy, enucleation 48/Radiotherapy	Blood	Exome g.70286C>A c.1172C>A	p. Ser391X Truncated pRB	Novel Hereditary
711	Sporadic Bilateral	17 Enucleation, chemotherapy	Blood	Exome g.5550G>A c.264G>A	p. Leu88Leu/skip aberrant splicing	Reported 3 times Hereditary
714	Sporadic Bilateral	5 Enucleation, chemotherapy	Blood	Exome g.153311A>T c.1918A>T	p. Lys640X	Novel Hereditary
717	Sporadic Bilateral	1/Enucleation, Intra-arterial and intravitreal chemotherapy Cryocoagulation Brachytherapy	Blood	Exome g.76487G>A (14_in) c.1389+1G>A	altered splicing	Reported 2 times Hereditary
718	Sporadic Bilateral	24 Intra-arterial chemotherapy	Blood	Exome g.156839del (20_in) c.2106+1del	altered splicing	Report once Hereditary A newly born sibling could be excluded from RB risk
710	Sporadic Unilateral	60 Enucleation	Blood	Exome MLPA No detected	-	-
712	Sporadic Unilateral	60 Enucleation	Blood	Exome g.2104_2112del c.45_53del	p. Ala16_Ala18del Uncertain	Reported 7 times Hereditary
713	Sporadic Unilateral	32 Enucleation	Blood	Exome MLPA No detected	-	-
715	Sporadic Unilateral	5 Enucleation	Tumor Blood	MLPA g. *ITM2B-5_DLEU1-2*del homozygous No mutation	*RB1* entire gene and surrounding genes deletion WT	Infrequent Not hereditary
716	Sporadic Unilateral	31 Enucleation	Blood	Exome MLPA No detected	-	-
719	Sporadic Unilateral	20 Enucleation	Blood	MLPA g. *ITM2B-5_PCDH8-2→?*del heterozygous	*RB1* entire gene and surrounding genes deletion Likely contiguous deletion syndrome	Recurrent Hereditary
720	Sporadic Unilateral	24 Enucleation	Tumor Blood	MLPA: g. *ITM2B5_RCBTB2-8?*del homozygous No mutation	*RB1* entire gene and surrounding genes deletion WT	Recurrent Not hereditary
721	Sporadic Unilateral	17 Enucleation	Tumor Blood	Exome g.768798C>T c.1399C>T No mutation	p. Arg467X WT	Recurrent Not hereditary

En un caso familiar bilateral (ID 709), se detectó una mutación sin sentido (c.1172C>A) en el exón 12, tanto en el hijo como en el padre ambos afectados. Esta mutación conduciría a la activación del mecanismo de degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras (sus siglas en inglés son: NMD, de Nonsense Mediated Decay) ya que aparece un codón stop prematuro en el exón 12 de los 27 exones que tiene el gen *RB1*.

El paciente ID 714, con un Rb bilateral esporádico, presentó también una mutación sin sentido, debida a una sustitución c.1918A>T en el exón 19, que igualmente conduciría a la activación del mecanismo de NMD ya que aparece un codón stop prematuro en el exón 19.

El paciente ID 711, con un Rb bilateral esporádico, presentó una sustitución (c.264G>A) en el último nucleótido del exón 2; según reportes previos, esta variante conduce a un splicing aberrante.

En dos Rb bilaterales, se detectaron variantes en el sitio dador de splicing, una sustitución G>A en el intrón14 (ID 717) y una deleción de G en el intrón 20 (ID 718). Además, se pudo excluir del riesgo a un hermano recién nacido.

En 5 de los 8 pacientes unilaterales (62.5%), se encontraron mutaciones en la sangre, lo cual indica su origen germinal y por lo tanto la forma hereditaria de retinoblastoma. Todas las mutaciones fueron de novo ya que no estaban presentes en los padres de los pacientes.

La presencia de una mutación germinal en un paciente unilateral no es un hecho frecuente ya que la mayoría de los unilaterales (aproximadamente 80%) tienen solo mutaciones en el tumor (somáticas).

En dos de los pacientes unilaterales (ID 715 y ID 720), se detectó en el tumor una deleción homocigota del gen RB1 y de genes vecinos, esta mutación no estaba presente en la sangre indicando Rb no Hereditario. En otro paciente unilateral (ID 719), se identificó una deleción germinal heterocigota del gen RB1 y genes vecinos, indicando Rb hereditario

En el paciente ID 721, con Rb unilateral esporádico, se detectó una sustitución c.1399C>T en el exón 15, que provoca la aparición de un codón de terminación prematuro y la consecuente activación de NMD.

En 3 pacientes, en los que no se detectaron pequeñas mutaciones ni grandes rearreglos en *RB1*, se identificaron variantes de secuencia por análisis de exoma completo, aún no descriptas en las bases de datos:

PAT ID	PHENOTYPE	AGE AT DIAGNOSIS	TREATMENT	GENE GERMLINE MUTATION	LOCATION	HGVS.C	EXPECTED CONSEQUENCE	RECURRENCE
559	Bilateral Sarcoma	18 months	Enucleation Chemoteraphy Radioteraphy					
560	Bilateral	14 months	Laser	***PDE11A*** g.415907G>C	15_ex	c.2245-1G>C	aberrant splicing	Novel
703	Sporadic Unilateral	10 months	Intra-arterial chemotherapy	***NF1*** 1) g.268502A>T het 2) g.268503G>T het	54_in	c.7971-2A>T het c.7971-1G>T het	aberrant splicing aberrant splicing	Novel Novel

El gen *PDE11A* codifica un miembro de la superfamilia de proteínas PDE (fosfodiesterasa). Las PDE de nucleótidos cíclicos 3 ', 5' catalizan la hidrólisis de cAMP y cGMP a los correspondientes 5'-monofosfatos y proporcionan un mecanismo para regular a la baja la señalización de cAMP y cGMP. Las mutaciones en este gen son una causa de enfermedad de Cushing e hiperplasia adrenocortical.

El gen *NF1* codifica neurofibromina. Este producto génico parece funcionar como un regulador negativo de la vía de transducción de señales ras. Las mutaciones en este gen se han relacionado con la neurofibromatosis tipo 1, la leucemia mielomonocítica juvenil y el síndrome de Watson.

CONCLUSIONES

La identificación de mutaciones permite detectar la predisposición a retinoblastoma en los futuros hermanos e hijos de pacientes para un tratamiento temprano, tendiente a preservar la vida y la visión. La identificación de mutaciones germinales en pacientes unilaterales permite detectar el riesgo de desarrollo de tumor en el otro ojo y su ausencia descarta la necesidad de exámenes oculares frecuentes bajo anestesia. La presencia de mutaciones en el tumor y su ausencia en los leucocitos de sangre periférica indican la forma no hereditaria de Rb.

Las mutaciones en los sitios de splicing generan un splicing alterado, con la consecuente aparición de codones stop prematuros, lo que conduciría a la activación del mecanismo de degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras (NMD). Esto da como resultado ausencia de la proteína del retinoblastoma y por lo tanto falta de control de la proliferación celular.

La presencia de una gran deleción en el cromosoma 13 en un paciente unilateral sugiere el desarrollo de pocos tumores unilaterales, debido a la inviabilidad celular en ausencia de grandes regiones del cromosoma.

El subsidio nos permitió ampliar los estudios moleculares ofrecidos a otras familias con Rb, pudiendo así acceder a la confirmación del diagnóstico clínico y establecer el estándar de cuidado para preservar la visión y el asesoramiento genético.

Por otro lado, los estudios nos permitieron identificar alteraciones moleculares en otros posibles genes asociados con el desarrollo de Rb y llevar a cabo una caracterización de la población afectada con Rb en Argentina.

A su vez, la información que brindaron estos estudios conduce a una mayor comprensión de las bases genéticas y moleculares del Rb, siendo imprescindible para los grupos de trabajo dedicados al desarrollo de un tratamiento o cura para esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- "RB1 gene mutations in Argentine retinoblastoma patients. Implications for the genetic counseling". Diana Parma, Marcela Ferrer, Leonela Luce, Florencia Giliberto, Irene Szijan. PLOS ONE | https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189736 December 20, 2017.
- "Mutations in the RB1 Gene in Argentine Retinoblastoma Patients and Uncommon Clinical Presentations". Ottaviani Daniela, Parma Diana, Ferrer Marcela, Giliberto Florencia, Luce Leonela, Alonso Cristina and Szijan Irene. J Genet Disor Genet Rep 2015; 4:1-7. ISSN: 2327-5790.
- "Spectrum of RB1 Mutations in Argentine Patients: 20-years Experience in the Molecular Diagnosis of Retinoblastoma". Ottaviani D, Parma D, Giliberto F, Ferrer M, Fandiño A, Davila MT, Chantada G and Szijan I. Ophthalmic Genetics 2013; 34 (4): 189-98. ISSN: 1381-6810

ABSTRACT

Retinoblastoma (Rb) is the most common malignant intraocular tumor of childhood, caused by mutations in the *RB1* tumor suppressor gene. Rb can be hereditary (bilateral tumors) or non-hereditary (mostly unilateral tumors). The first mutation is germinal (hereditary Rb) or somatic (non-hereditary Rb), the second mutation is always somatic. Rb is a potentially curable cancer with early treatment, and patients with hereditary Rb can pass the predisposition to their children. Our objective was to identify mutations in *RB1* to determine the risk for future children and siblings of bilateral patients and to discriminate between hereditary and non-hereditary forms in unilateral patients. Blood samples from Rb patients were tested for germline mutations. Tumor samples were also analyzed in order to detect somatic mutations.

17 patients were studied, 8 patients with bilateral Rb and 9 patients with early unilateral Rb. Whole exome sequencing (WES) was used for small variants and MLPA for large alterations. Mutations in the *RB1* were identified in the blood of 6 bilateral patients (4 of them with sporadic Rb) and in 5 unilateral patients with sporadic Rb. Analysis of the 3 tumor samples from unilateral patients revealed mutations in all three. Nonsense mutations, variants that alter splicing, and deletions of the *RB1* and neighboring genes were detected. The pathogenicity of the identified variants was determined according to their population frequency, functional impact in coding regions or in messenger RNA maturation, previous report in the database of patients with Rb as pathogenic, and classification according to programs that predict the effect of the mutation. A newborn sibling could be excluded from risk.

The identification of mutations makes it possible to detect predisposition to Rb in future siblings and children of patients for early treatment, aimed at preserving life and vision. The identification of germline mutations in unilateral patients allows detecting the risk of tumor development in the other eye and their absence rules out the need for frequent ocular examinations under anesthesia.

POLIMORFISMOS EN DECTIN-1 Y LA INFECCIÓN TUBERCULOSA

Mercedes Pastorini

Instituto de Medicina Experimental. IMEX - CONICET - ANM

INTRODUCCIÓN

Con más de un tercio de la población mundial infectada con Mycobacterium tuberculosis (Mtb) y tres millones de personas muertas por la enfermedad cada año, la tuberculosis (TB) es un problema global emergente y sigue siendo en la actualidad un gran problema de salud pública (1). Todas las especies de Mycobacterium comparten una pared celular característica, más gruesa que la de muchas otras bacterias, hidrofóbica, cerosa, y rica en ácidos micólicos (2). El compartimiento más externo de la envoltura celular de las especies de micobacterias patógenas, consiste en una estructura débilmente unida llamada cápsula compuesta por hidratos de carbono y proteínas con pequeñas cantidades de lípidos (3, 4) y muchos de sus componentes de pared son reconocidos por el receptor TLR2. En este sentido, estudios epidemiológicos que analizan polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en los genes de los pacientes con TB encontraron SNPs en el gen de TLR2 que afectan la susceptibilidad ante TB (5). Otros estudios epidemiológicos analizan polimorfismos en la proteína 1 del macrófago (NRAMP1), asociado a la resistencia natural, en el receptor de tipo Toll 2 (TLR2), en la interleuquina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), el antagonista del receptor de interleuquina-1, IL- 10, el receptor de vitamina D (VDR), DC-SIGN, en la proteína quimioatractante de monocitos 1 (MCP-1), el dominio de unión a oligomerización de nucleótidos 2 (NOD2), Interferón-gamma (IFN-γ), de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lectina de unión a manosa (MBL) y proteína surfactante A (SP-A). También otros receptores de membrana celular, tales como el receptor de manosa (MR, CD206), el receptor 3 del complemento (CR3, CD11b/CD18), y receptores citosólicos intracelulares, tales como NOD1 y NOD2. Los resultados han sido variables según la cohorte, salvo para TLR2 cuyas mutaciones puntuales, afectan la susceptibilidad ante TB, incluyendo R753Q (exón), R677W (exón), \ Delta 597T / C y P631H. R753Q que influencia la progresión de la TB en los niños y TLR2 597T / C fuertemente asociado con la TB miliar (5)

Una de las líneas de investigación de nuestro grupo analiza los mecanismos que intervienen en la generación del estallido respiratorio y las consecuencias que este proceso tiene en la enfermedad tuberculosa, propiciando el montaje de la respuesta inmune adaptativa. Demostramos que la interacción simultánea de Mtb con Dectin-1 y TLR2 induce la generación de ROS 1) en los neutrófilos llevando a la activación de p38 MAPK y Syk conduciendo a la apoptosis de la célula (6), y 2) en la dendrítica induciendo

la maduración y favoreciendo la presentación antigénica (7). Sin embargo, la relación del polimorfismo en Dectin-1 con la enfermedad tuberculosa no ha sido estudiada hasta la actualidad. Dectin-1 es una proteína transmembrana de tipo II de 28 KDa con un único dominio CRD, que se expresa en macrófagos, monocitos, neutrófilos y algunas células T. El papel de Dectin-1 en la regulación de una respuesta inmune sólo se ha abordado en el contexto de actividad anti-fúngica debido en gran parte a que tiene capacidad de unir glucanos como β-1,3 y β-1,6 que están expresados sobretodo en levaduras, hongos, plantas y un pequeño número de bacterias (8). Un polimorfismo funcional de un solo nucleótido en Dectin-1 (Y238X, rs16910526) genera un codón de stop temprano, dando lugar a la pérdida de los últimos 10 aminoácidos del dominio de reconocimiento de carbohidratos del receptor reduciendo su capacidad para unirse a β-glucanos (9, 10). Esta variante ha sido registrada en la base de datos dbSNP, como rs16910526.

Dicho polimorfismo está asociado a la colonización con especies de Cándida en trasplantados de médula ósea y a micosis cutáneas recurrentes. También está asociado a una menor expresión del receptor en membrana y la unión a β-glucanos llevando a una producción defectuosa de IL-17, TNF, e IL-6 (11). Varios estudios también han demostrado una acción conjunta de Dectin-1 con TLR2 no solo en hongos sino también en especies de Mtb (12). La identificación de este polimorfismo en todas las poblaciones africanas evaluadas sugiere que esta es una mutación antigua que muy probablemente surgió hace más de 60.000 años, antes de la división de las poblaciones humanas modernas a finales del Paleolítico (13) y además la prevalencia en estas poblaciones puede representar una susceptibilidad genética importante a variadas infecciones fúngicas.

Considerando que se ha encontrado una asociación del polimorfismo en Dectin-1 con enfermedades humanas por infecciones con diferentes hongos y habiéndose demostrado que dicho receptor participa en la generación de ROS inducida por Mtb afectando la funcionalidad de las células del sistema inmune, nuestra hipótesis es que existe una asociación entre la presencia del polimorfismo y la disminución del estallido respiratorio. Esto incidiría en la respuesta inmune innata resultante contra la enfermedad tuberculosa. Así pues, evaluamos la frecuencia del polimorfismo en la población, y la posible asociación entre la mutación y la enfermedad tuberculosa, en relación a la clínica del paciente, parámetros funcionales in vitro y expresión de Dectin-1 en la membrana de neutrófilos.

RESULTADOS

Evaluación del estado de las poblaciones celulares en dadores sanos y pacientes TB.

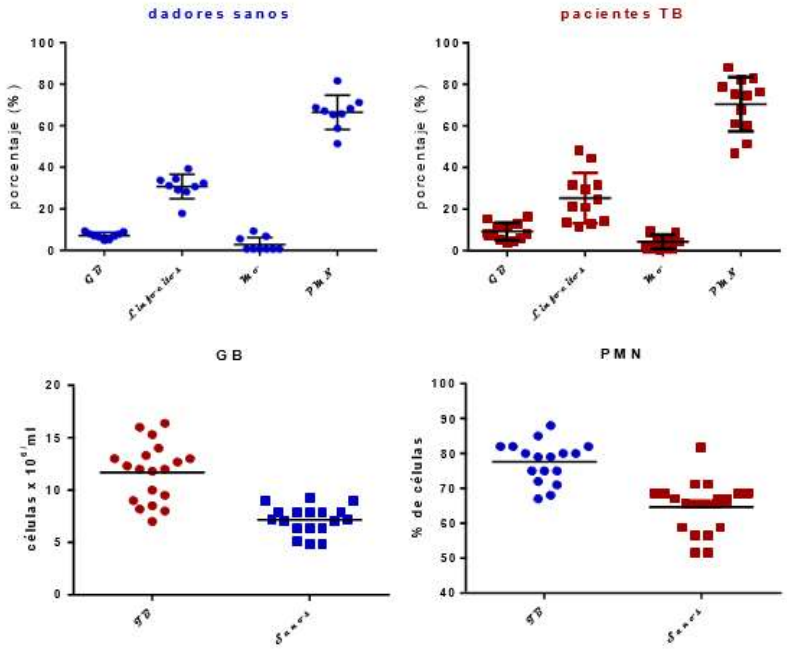


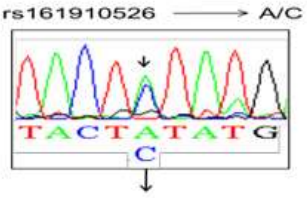
Figura 1. Composición celular de las muestras de sangre de dadores sanos y pacientes. Las muestras fueron analizadas en un *Coulter* hematológico.
WBC: glóbulos blancos totales; Lym: linfocitos (%), Mo: monocitos (%), Gr: neutrófilos (PMN, %).
Pacientes (TB) presentan WBC y PMN significativamente mayores que los dadores sanos (HS), *p< 0.002.

Las muestras a estudiar fueron evaluadas para determinar diferencias entre las poblaciones celulares. Para ello, se realizó el recuento celular dando como resultado una diferencia significativa en el recuento de glóbulos blancos totales y también el porcentaje de polimorfonucleares/neutrófilos (PMN) en los pacientes tuberculosos (Figura 1), algo que ya se había documentado en trabajos anteriores de nuestro grupo (14). Los pacientes presentan elevados los glóbulos blancos, que se debe al significativo aumento de los PMN, característico de las formas graves de TB.

Evaluación de la presencia del SNP y frecuencia alélica en la población total.

Se seleccionaron los oligonucleótidos para la amplificación de la región del ADN que comprende a la secuencia codificante que contiene la región donde se encuentra la mutación del gen Dectin-1 (Y238X, rs16910526), basándose en trabajos anteriores (11). Debajo se muestran los nombres, secuencias y temperaturas de hibridación correspondientes a los oligonucleótidos destinados a amplificar una región del exón 6 del gen en la secuencia de ADN de Homo sapiens. Además, se llevó a cabo la puesta a punto de la reacción de amplificación, y se determinó el perfil de ciclado a utilizar. Luego se realizaron las reacciones de amplificación para 50 muestras obtenidas y se observó una buena cantidad y calidad de producto (Figura 2).

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Tº de hibridación
Dectin-1 Fw	AATCACAGCCTCTCCCTTCA	62°C
Dectin-1 Rv	GATTTAAGCCTCCTTTTCCAA	60°C



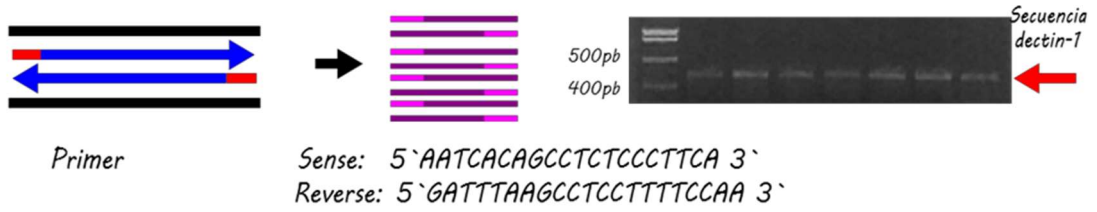


Figura 2: Esquema representativo de las electroforesis en gel de agarosa 2% m/v. Se señala con una flecha el producto amplificado, de tamaño esperado de aproximadamente 250 pares de bases.

Al estudiar las secuencias obtenidas de Dectin-1 en las muestras de los pacientes, se determinó la frecuencia del haplotipo en la población total estudiada. La mutación que se está estudiando es la Y238X, rs16910526 que consta de un cambio de Adenina por Citocina. Los cromatogramas resultantes fueron analizados para corroborar una buena calidad de la técnica y se acotaron las zonas de estudio. Las secuencias resultantes fueron analizadas con el programa DNA Sequence Assembler v5 (http://www.dnabaser.com/download/DNA-Baser-sequence- assembler/index.html). Se encontró que el haplotipo heterocigota del SNP se encuentra en un 17% de la población de nuestro país, y la frecuencia génica es de 33% (Figura 3).

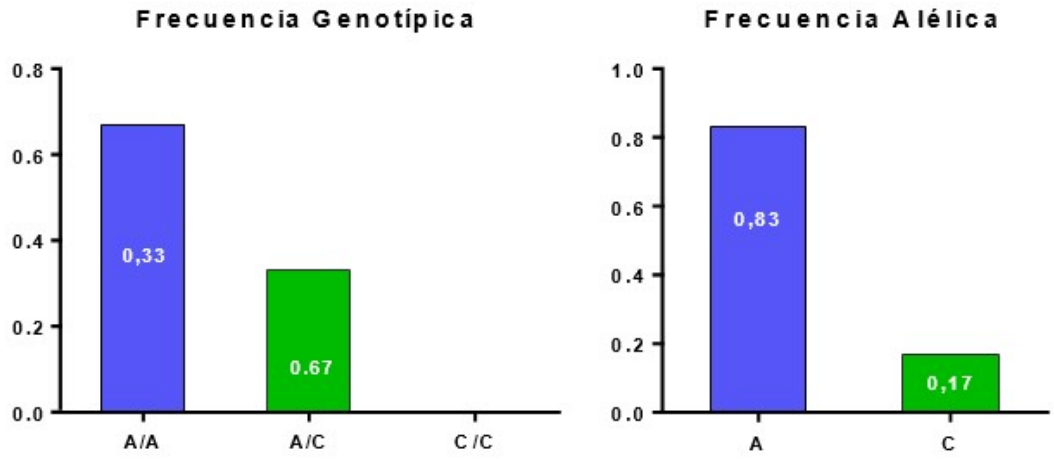


Figura 3: Frecuencia genotípica y frecuencia alélica del SNP Y238X, rs16910526 en la población general estudiada (n=40)

Evaluación de la expresión de Dectin-1 en PMN de TB y dadores sanos.

Ha sido descrito que las células heterocigotas para el polimorfismo Y238X presentan disminuida la expresión de Dectin-1 en la superficie de la célula (11). A partir de muestras de pacientes, se purificaron las células polimorfonucleares (PMNs) y se evaluó la expresión de Dectin-1 en su superficie mediante de la marcación con anticuerpos anti-Dectin-1-PE (clon 259931 humano). La Figura 4 muestra que, si bien han sido variables, los pacientes con TB presentan una menor expresión del receptor comparado con la población de dadores sanos, quienes podrían ser susceptibles o no a la enfermedad.

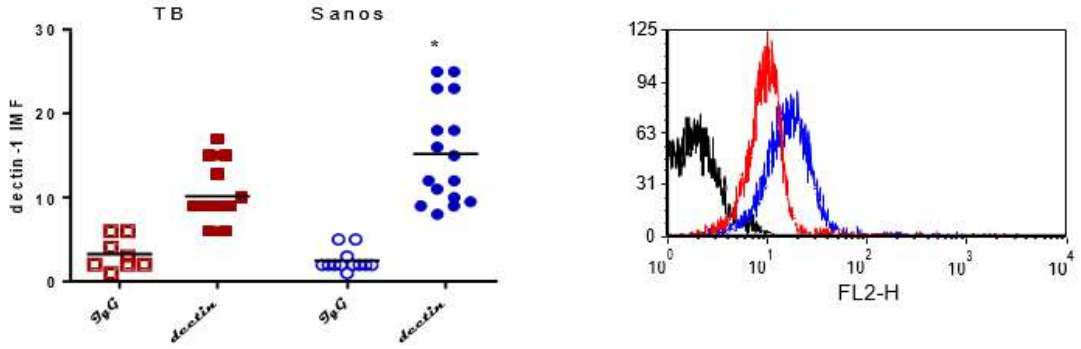
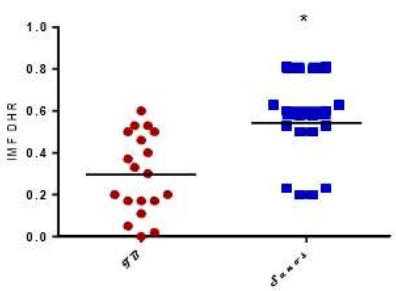


Figura 4. Expresión de Dectin-1 en neutrófilos de sangre periférica de dadores sanos y pacientes con TB. En color rojo se muestran los datos correspondientes a los pacientes de TB, en azul los dadores sanos y en negro se muestra el control de isotipo mostrando que no hay pegado inespecífico. Los pacientes de TB presentan en general menor expresión de Dectin-1 por célula (MFI) respecto de dadores sanos (azul) ($p<0.02$).

Evaluación de la generación de ROS en PMN de TB y dadores sanos.

Por otra parte, resultados obtenidos en nuestro grupo mostraron que la generación de ROS requiere la interacción simultánea de Mtb con Dectin-1 y TLR2 induciendo la activación de los neutrófilos y apoptosis de la célula, y en las células dendríticas induce la maduración favoreciendo la presentación antigénica.

A fin de poder buscar una asociación funcional con la presencia del polimorfismo, inicialmente evaluamos los niveles de ROS en la población de PMN de dadores sanos y pacientes con TB. Como consecuencia, observamos que los dadores sanos son capaces de inducir niveles significativamente mayores de ROS en respuesta al Mtb (*$p< 0,02$). En relación con los resultados previos mostrados en la figura 4, esto se puede asociar con una mayor expresión de Dectin-1 (*$p< 0.02$) en dadores sanos.



	ROS incr %	/Rel dectin
TB (n= 11)	16± 2	P<0,09
HS (n= 9)	43 ± 5	P<0,02*

Figura 5. Los neutrófilos de los dadores sanos presentan un mayor incremento en la generación de ROS respecto de su control.

Presencia del SNP en pacientes TB y dadores sanos.

Se determinó la frecuencia del haplotipo en la población de pacientes y dadores sanos separadamente y encontramos que la población de pacientes con TB tiene una frecuencia genotípica de 0,46 (mutación Y238X, rs16910526) que es significativamente (OD ratio 2,4285; p< 0.005) mayor a la frecuencia genotípica en los dadores sanos (0.24), mientras que no se encontró el genotipo homocigota CC (ambos alelos mutados) en ningún caso.

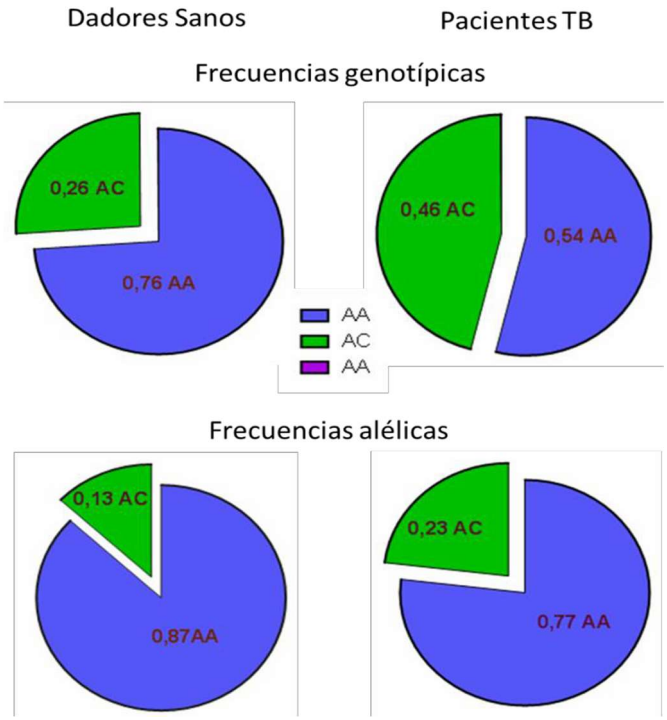


Figura 6. Distribución genotípica y alélica del SNP Y238X, rs16910526 en ambas poblaciones. Los valores de p se calcularon mediante la prueba de homogeneidad χ^2. Ambas poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW).

Frecuencia alélica en dadores sanos y relación con la producción de ROS.

Encontramos además, que aquellos dadores sanos que presentaban la mutación, exhibían un menor nivel de ROS inducido por Mtb (0.05).

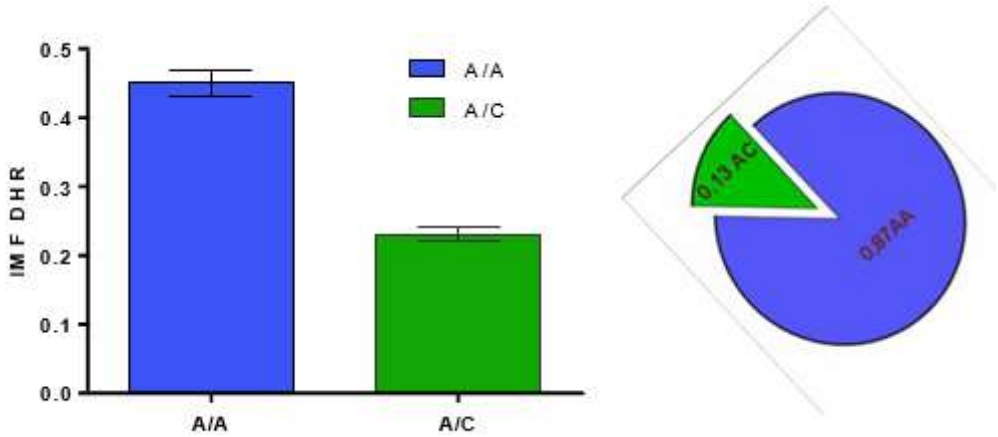


Figura 7. Presencia del SNP Y238X, rs16910526 en dadores sanos y capacidad de generar estallido respiratorio (ROS) en el PMN en respuesta a Mtb. IZQ. Intensidad Media de fluorescencia promedio de las muestras, proporcional al ROS en pacientes homocigotas sin mutación y heterocigotas mutados. DER. Frecuencia alélicas de homocigosis o heterocigosis en muestras de pacientes analizadas.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

La susceptibilidad a sufrir infecciones está fuertemente ligada a factores ambientales y genéticos. Los factores genéticos podrían deberse a determinados polimorfismos que afectan al funcionamiento normal del sistema inmune y comprometen particularmente el reconocimiento de patógenos.

Nuestro grupo investiga los mecanismos que intervienen en la generación del estallido respiratorio y las consecuencias que este proceso tiene en la enfermedad tuberculosa, propiciando el montaje de la respuesta inmune adaptativa. Previamente hemos demostrado que la interacción simultánea de Mtb con Dectin-1 y TLR2 induce la generación de ROS 1) en los neutrófilos llevando a la activación de p38 MAPK y Syk conduciendo a la apoptosis de la célula (6), y 2) en las células dendríticas induciendo la maduración y favoreciendo la presentación antigénica (7). El papel de Dectin-1 en la regulación de una respuesta inmune sólo se ha abordado en el contexto de actividad anti-fúngica debido en gran parte a que tiene capacidad de unir β-glucanos tales como β-1,3 y β- 1,6 que están expresados mayormente en levaduras, hongos, plantas y un pequeño número de bacterias (8). Sin embargo, la relación del polimorfismo en Dectin-1 con la enfermedad tuberculosa no ha sido estudiada hasta hoy. Así, planteamos la hipótesis de que la presencia del polimorfismo (Y238X, rs16910526) que genera una pérdida de parte del dominio de reconocimiento con los ligandos (9, 10) podría implicar un aumento del riesgo de infección tuberculosa.

Los resultados obtenidos sobre la muestra de pacientes (n=40) mostraron que la presencia del polimorfismo en Dectin-1 es más frecuente en los pacientes que desarrollan infección tuberculosa que en la población sana (OR 2,4285; $p< 0.005$). Dichos pacientes, cursan con neutrofilia, que se traslada a un recuento elevado de glóbulos blancos. A pesar del elevado número de neutrófilos (PMN), éstos tienen menor capacidad de inducir estallido respiratorio en promedio ($p<0.02$) que, a su vez, se relaciona con una menor expresión del receptor Dectin-1 ($p< 0.02$). Éste está involucrado en el reconocimiento de la bacteria y la posterior transducción de las señales que activan la NADPH oxidasa, enzima que interviene en la generación de intermediarios reactivos del oxígeno (ROS). Los ROS son tóxicos para gran variedad de microorganismos y por eso son importantes en la eliminación de los mismos. Sin embargo también tienen un rol fundamental en la señalización intracelular que lleva a la apoptosis, lo que disminuye la activación del neutrófilo, controlando la inflamación (15), y a su vez favoreciendo la presentación de antígenos por las células dendríticas para montar una buena respuesta específica de memoria contra Mtb (6). Dentro de la cohorte de individuos sanos, aquellos que presentan el polimorfismo, tienen menor expresión de Dectin-1 y una menor capacidad de inducir estallido respiratorio (ROS). Sin embargo, desconocemos si mostrarán susceptibilidad a desarrollar o no la enfermedad en caso de padecerla. Dado que, para que se cumpla el equilibrio de Hardy-Weinberg la muestra poblacional debe ser extensa, se necesitaría un número de pacientes y dadores sanos mayor para poder obtener resultados

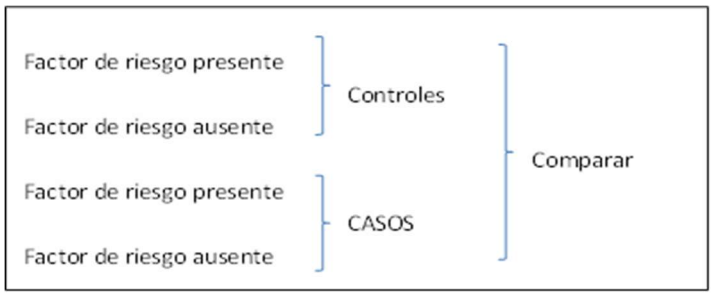
estadísticamente robustos y con suficiente validez externa que nos permitiera su aplicación en la práctica clínica.

Es importante señalar que, en contraste con los hongos, Dectin-1 parece no ser necesario para la fagocitosis de micobacterias. La explicación más probable es que, la pérdida de un receptor sería compensado por otros receptores. Clínicamente, se encontró que este polimorfismo estaba asociado a la colonización con especies de Cándida en trasplantados con células madre hematopoyéticas y a micosis cutáneas recurrentes, provocando además una baja expresión del receptor en membrana, una reducción en la unión a β-glucanos, y una producción defectuosa de IL-17, TNF, e IL-6 (11). En este trabajo, la identificación del genotipo rs16910526 heterocigota como biomarcador de susceptibilidad en la enfermedad tuberculosa y el papel del estallido respiratorio en la inmunofisiología de la tuberculosis podría contribuir a diseñar vacunas más eficaces y a identificar subpoblaciones de riesgo en Argentina. Además, la asociación del genotipo rs16910526 con una mayor gravedad de la tuberculosis podría colaborar en la implementación de nuevas estrategias de tratamiento dirigidas al huésped.

METODOLOGÍA

La variable a evaluar fue la presencia o no del polimorfismo funcional de un solo nucleótido (SNP) en Dectin-1 (Y238X, rs16910526), en población de pacientes con tuberculosis y dadores sanos.

Tipo de estudio:
Casos Controles
Sin intervención



Muestras de sangre venosa.

- 25 muestras de participantes sanos Hemocentro Buenos Aires. Edad promedio 35±5.
- 25 muestras de pacientes participantes con tuberculosis activa sensible drogas de la División Tisioneumonología del Hospital de Infecciosas Dr. Francisco J. Muñiz. Edad promedio 25±5.

En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado tanto para la extracción de las muestras de sangre como para participar en el estudio de investigación sugerido por el Comité de Ética del Hospital Francisco Muñiz.

Se realizó la venopunctura con agujas 19G estériles (mariposa) y jeringas estériles y se obtuvo un volumen de 30 mL de sangre venosa, en tubos cónicos con heparina.

Criterio de inclusión, exclusión y eliminación: La clasificación de los individuos participantes fue realizada por el equipo médico involucrado en el proyecto. Los individuos fueron diagnosticados por la presencia de síntomas recientes de tuberculosis, por la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en esputo y confirmada por cultivos positivos para Mtb y por radiografías de pulmón. Se excluyeron aquellos con serología positiva para HIV y/o otras enfermedades infecciosas. De las historias clínicas se tuvieron en cuenta los siguientes datos:

- Edad y sexo.
- Fecha de negativización del esputo y de cultivo.
- Datos de RX de tórax.
- Status de la PPD.
- Drogas anti-TB empleadas.
- Hemograma completo.

Traslado de las muestras.

Fue realizado de acuerdo a los lineamientos para el transporte de muestras biológicas por un integrante del IMEX-CONICET que participa en el proyecto. 1º) Recipiente primario estanco, a prueba de filtraciones, etiquetado, que contiene la muestra. El recipiente será envuelto en material absorbente. 2º) Recipiente secundario estanco, a prueba de filtraciones, que encierra y protege el recipiente primario 3º) Recipiente externo de envío.

Extracción de ADN de las muestras de los participantes.

Se emplearon Kits de extracción Puro Genomic DNA de PB-L (productos biológicos) Cat nº: SA05. Brevemente, 200 µl de sangre entera se trataron con 20 µl de proteinasa K mezclando con vórtex. Luego, se agregaron 200 µl de buffer GA mezclando con vórtex incubándose 15 minutos a 56º C homogenizando de vez en cuando. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 30 segundos, luego de lo cual se agregaron 200 µl de etanol mezclando con vórtex durante 15 segundos. Se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 30 segundos y el sobrenadante se trasvasó a la columna de purificación centrifugándose a 12000 rpm por 30 segundos. Se descartó el eluato, se agregaron 500 µl de buffer GB y se centrifugó a 12000 rpm por 30 segundos. Luego se secó la columna y se la misma se colocó en un tubo limpio de 1,5 mL. Se agregaron 100 µl de buffer de elusión, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos y se guardó el ADN obtenido a -20ºC.

Amplificación del ADN de las muestras de los participantes.

La secuencia de Dectin-1 se amplificó con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final utilizando oligonucleótidos específicos para la región donde se estudió la presencia de la mutación puntual (SNP).

Secuencias de los oligonucleótidos:

Forward:5`AATCACAGCCTCTCCCTTCA3`

Reverse:5`GATTTAAGCCTCCTTTTCCAA 3`

Se utilizó una polimerasa de alta fidelidad – PFU ADN polimerasa de PB-L (productos biológicos) Cat nº: EA00201-100 U. También se utilizaron dNTPs para la amplificación – Set de dNTPs ultra puro de PB-L (productos biológicos) Cat nº: IK0101.

Las muestras una vez amplificadas fueron enviadas a secuenciar a la empresa Macrogen (Korea).

Separación de las poblaciones celulares.

Las muestras de sangre se diluyeron al medio con solución fisiológica (SF) y se sembraron sobre una solución de Ficoll-Hypaque (HyClone, UT, USA). Luego de centrifugar a 350 g durante 40 minutos a 4º C, se obtuvo finalmente una interfase conteniendo las células mononucleares (CM) y un sedimento de eritrocitos y granulocitos.

Fracción de eritrocitos y granulocitos: purificación de los neutrófilos (PMN).

El sedimento resultante de gradiente de Ficoll-Hypaque se diluyó al medio con SF y luego se le agregó dextrán al 6 %, en una proporción de seis volúmenes de suspensión celular diluida, a 1 volumen de dextrán. Se dejó sedimentar 20 minutos a temperatura ambiente y luego se colectó el sobrenadante rico en PMNs removiendo los glóbulos rojos por lisis hipotónica durante 1 minuto a 4º C, restituyendo inmediatamente la isotonicidad. Las células purificadas fueron lavadas inmediatamente y se suspendieron a una concentración de 3 x 106 células por mililitro (cel/mL) en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, NY, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% inactivado por calor (Gibco, NY, USA) conteniendo penicilina/estreptomicina (100 U/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo). La viabilidad celular resultante se determinó por la exclusión del colorante vital, azul de tripán y la pureza de la población de PMNs resultante por la examinación morfológica con tinción de Wright-Giemsa, el recuento en cámara de Neubauer empleando el colorante de Türk y por el patrón observado por un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

Detección de antígenos en la superficie celular.

Se evaluó la expresión de Dectin-1 y TLR2 en los PMNs por medio de la marcación con anticuerpos anti-TLR2-FITC (clon TL2.1) y anti-Dectin-1 (clon 259931) humano hecho en ratón. Se evaluó también la expresión de marcadores de activación CD11b y FcγRIIIb (CD16) en la superficie de los PMNs expuestos o no al Mtb por fluorescencia directa usando anticuerpos anti CD11b y CD16 humanos hechos en ratón conjugados a fluoróforos. Para determinar la auto- fluorescencia y pegado inespecífico, se utilizó como control anticuerpos de especificidad irrelevante (control de isotipo). Para esto, se incubaron 5 x 105 células con el correspondiente anticuerpo durante 20 minutos en hielo. Las células se lavaron, y se fijaron con 50 µl de una solución de paraformaldehído (PFA) al 1 %. Se recolectaron 10.000 eventos en un citómetro de flujo en el modo lineal para Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC), y amplificación logarítmica para FL-1 y FL-2. Se empleó el software de análisis CellQuest (Becton-Dickinson) expresándose los resultados como porcentaje de células positivas o intensidad media de fluorescencia (IMF).

Ensayo de estallido respiratorio por oxidación de Dihydrorhodamina 123 (DHR).

El nivel de ROS intracelular, se determinó por la oxidación del colorante no fluorescente Dihydrorhodamina 123 (DHR) a Rhodamina 123 (fluorescente). La DHR se llevó a una concentración de 20 µg/mL en DMSO almacenándose en alícuotas a -70 °C hasta su uso. Para el ensayo en PMNs, se incubaron 5x105 PMNs con 100 µL de DHR (5 µg/ml) durante 15 minutos a 37º C, luego de lo cual, las células se enfrentaron a Mtb (1 x 108 bacilos/ml) durante 90 minutos adicionales, en una relación (1:1) Mtb:PMN.

Descarte del material biológico.

El descarte del material biológico de los participantes se realizó siguiendo las normas establecidas por el comité de Bioseguridad del Instituto de Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina. Los mismos fueron tratados como residuos patogénicos (Manual de Gestión de Residuos Patogénicos, Ley 154, 18 febrero 1999).

Estadística.

Se calcularon los odds ratio (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95% utilizando análisis de regresión múltiple. Los análisis de asociaciones de riesgo para el polimorfismo fueron ajustados por recuento de glóbulos blancos, fecha de negativización del esputo y de cultivo, datos de RX de tórax, nivel de radicales de oxígeno, activación celular. Las características cuantitativas se expresaron por el valor de la mediana. Se empleó la prueba t de Student (paramétrica, de dos colas) y la prueba de χ^2 para identificar diferencias estadísticas cuando fue apropiado. El nivel de significación se considera estadísticamente significativo con un valor de p de 0,05.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018 - Geneva. WHO report. 2018.
2. Daffé M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. Vol. 39, Advances in Microbial Physiology. 1997. 131–203 p.
3. Lemassu A, Daffé M. Structural features of the exocellular polysaccharides of Mycobacterium tuberculosis. Biochem J [Internet]. 1994 Jan 15;297:351–7. Available from:http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1137836&tool=pmcentrez&re ndertype=abstract.
4. Ortalo-Magné A, Dupont MA, Lemassu A, Andersen AB, Gounon P, Daffé M. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. Microbiology. 1995 Jul;141 (Pt 7:1609–20.
5. Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. Infect Immun. 2012;80(10):3343–59.
6. Romero MM, Basile JI, López B, Ritacco V, Barrera L, Sasiain M del C, et al. Outbreaks of Mycobacterium tuberculosis MDR strains differentially induce neutrophil respiratory burst involving lipid rafts, p38 MAPK and Syk. BMC Infect Dis. 2014;14(1).
7. Romero MM, Basile JI, Corra Feo L, López B, Ritacco V, Alemán M. Reactive oxygen species production by human dendritic cells involves TLR2 and dectin-1 and is essential for efficient immune response against Mycobacteria. Cell Microbiol. 2016;18(6):875–86.
8. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of β-glucans. J Exp Med. 2003;197(9).
9. Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, Zelante T, et al. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in

hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. Blood. 2010;116(24):5394–402.

10. Chai LYA, De Boer MGJ, Van Der Velden WJFM, Plantinga TS, Van Spriel AB, Jacobs C, et al. The Y238X stop codon polymorphism in the human b-glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. J Infect Dis. 2011;203(5):736–43.

11. Plantinga TS, Van Der Velden WJFM, Ferwerda B, Van Spriel AB, Adema G, Feuth T, et al. Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased candida colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis. 2009;49(5):724– 32.

12. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. J Exp Med [Internet]. 2003 May 5 [cited 2012 Jul 19];197(9):1107–17. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193968&tool=pmcentrez&rendert ype=abstract.

13. Underhill PA, Shen P, Lin AA, Jin L, Passarino G, Yang WH, et al. Y chromosome sequence variation and the history of human populations. Nat Genet. 2000;26(3):358–61.

14. Alemán M, Schierloh P, De La Barrera SS, Musella RM, Saab MA, Baldini M, et al. Mycobacterium tuberculosis triggers apoptosis in peripheral neutrophils involving Toll-like receptor 2 and p38 mitogen protein kinase in tuberculosis patients. Infect Immun. 2004;72(9):5150–8.

15. Romero MM, Balboa L, Basile JI, López B, Ritacco V, de la Barrera SS, et al. Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis Differ in Their Ability to Induce Respiratory Burst and Apoptosis in Neutrophils as a Possible Mechanism of Immune Escape. Clin Dev Immunol [Internet]. 2012 Jan [cited 2012 Aug 10];2012:152546. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3388301&tool=pmcentrez&rendert ype=abstract.

ABSTRACT

Genomic studies show that host genetics strongly influence susceptibility to tuberculosis disease, for instance single nucleotide polymorphisms (SNPs) in molecules involved in immunity against Mycobacterium tuberculosis (Mtb). A Dectin-1 SNP (Y238X, rs16910526) generates an early stop codon, leading to the loss of the last 10 amino acids of the receptor, decreasing its expression in membrane and its binding to different ligands. This SNP is clinically associated with recurrent cutaneous mycoses; however, its association with tuberculosis disease has not been studied to date, nor is its genotypic frequency known in South America. We have previously demonstrated that Mtb induces the generation of reactive oxygen intermediates (ROS) in neutrophils and dendritic cells through interaction with Dectin-1, which favors the immune response against the mycobacteria. Thus, we studied the presence of the mutation and the possible association with the tuberculosis disease. We also evaluated the genotypic frequency in the population studied. For this, the coding sequence of Dectin-1 was amplified by end-point PCR from complementary DNA isolated from blood samples from patients and healthy

donors, and was subsequently sequenced to evaluate the presence of the mutation; the expression of Dectin-1 in the neutrophils' membrane and the level of intracellular ROS in response to Mtb insufficiency (1x108 bacilli/mL) by flow cytometry. Results show that TB patients showed lower Dectin-1 expression and ROS production compared to healthy donors ($p<0.02$). The heterozygous haplotype of the SNP has a genotypic frequency of 33% in the population in our country, with an allelic frequency of 0.231 in TB patients and 0.130 in healthy donors. Those patients with the SNP (20%) showed a slow sputum negativization time whereas those healthy donors with the SNP showed a lower production of ROS in neutrophils. In conclusion, these studies reveal a possible relationship between Dectin-1 mutation and the susceptibility or progression of tuberculosis disease. The number of individuals should be increased for the statistics to be robust.

LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO: MARCADORES PRONÓSTICOS

Silvia Daniela A. Perés [1], Sabrina Porta [2], Federico Aranda [1], Eduardo Mario Kerzberg [2]

[1] Hospital de Enfermedades Infecciosas "Dr. Francisco J. Muñiz", Sección Bioquímica-Hemostasia y Trombosis. [2] Hospital Gral. de Agudos "Dr. J. M. Ramos Mejía", Servicio de Reumatología y Colagenopatías

INTRODUCCIÓN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica, crónica y potencialmente mortal caracterizada por la inflamación y daño en múltiples órganos y sistemas del cuerpo, cuya etiología exacta es desconocida[1]. Actualmente, se estima que más de 5 millones de personas en todo el mundo se ven afectadas por LES, lo que representa un desafío significativo en términos de diagnóstico y tratamiento[2]. Si bien existe una predisposición genética para desarrollar LES, se ha demostrado que no es suficiente para desencadenar la enfermedad por sí sola. Factores hormonales y ambientales, como la exposición a ciertos medicamentos, infecciones virales y la radiación ultravioleta, también influyen en la expresión y progresión del LES[3].

Las manifestaciones clínicas y la gravedad de la enfermedad varían mucho entre los pacientes, con períodos de actividad, también conocidos como *flares,* que se alternan con períodos de remisión. Una complicación grave del LES es la glomerulonefritis, que causa proteinuria persistente grave pudiendo llevar a insuficiencia renal crónica y nefropatía[1,4].

Las Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) son estructuras en red compuestas por ADN, histonas y otras proteínas liberadas por los neutrófilos activados[5,6]. Algunos estudios sugieren que los pacientes con LES liberan una cantidad mayor de NETs que los individuos de control. Estas NETs son potentes activadoras de las células dendríticas mieloides, que secretan altos niveles de IFN-α, capaz de estimular aún más la NETosis[7-9]. Por otra parte, los pacientes con LES poseen una degradación deficiente de estas NETs. Como resultado, se produce un aumento en los niveles circulantes de NETs, con la capacidad de inducir injuria endotelial y tisular[9-11]; además de ser una fuente potencial de autoantígenos. Se observó que si las NETs no pueden ser degradadas completamente, tienden a unirse a otras proteínas, formando complejos con la capacidad de estimular el sistema inmunológico y asociarse al desarrollo de autoinmunidad[12]. El depósito específico de las NETs en la membrana basal glomerular produce inflamación y estaría relacionado con la patogenia de la glomérulonefritis lúpica[10,11].

Se ha observado que una de las causas de esta deficiente degradación de las NETs se debe a una disminución en la actividad de la enzima ADNasa I humana. Esta disminución de actividad puede ser ocasionada por la presencia de inhibidores específicos, la generación de anticuerpos anti-NETs que actúan protegiendo las trampas de la degradación enzimática, o bien, debido a factores genéticos[11]. A nivel genético, la ADNasa I humana es una enzima polimórfica, que puede tener diferentes isoformas con actividad reducida

o expresión génica alterada. El polimorfismo más frecuente, el Q222R (rs1053874) ha sido asociado a susceptibilidad para padecer LES[13,14]. Este produce la sustitución de Arg por Gln en la posición 244 de la proteína DNasa I (+2373A→G; Gln244Arg), la presencia del alelo G mutado disminuye *in vivo* la actividad específica de la enzima[15]. La frecuencia alélica de este polimorfismo depende de la etnia estudiada[16,17].

El aumento de los niveles residuales de NETs podrían explicar el hallazgo de niveles elevados de ADN libre circulante (ADNlc) en los pacientes con LES[18]. El ADNlc ha sido postulado como marcador subrogante de los niveles de NETs, con potencial uso para estratificar a los pacientes, monitorear la respuesta al tratamiento y predecir la progresión de la enfermedad.

En la búsqueda de biomarcadores tempranos y de fácil implementación, nuestro objetivo fue analizar la posible asociación entre los niveles plasmáticos de ADNlc y de la variante genética Q222R de la ADNasa I humana con el desarrollo de glomerulonefritis lúpica y otras complicaciones clínicas del LES. Asimismo analizar si esta variante génica se encuentra asociada al desarrollo de LES.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes y datos clínicos.

Se llevó a cabo un estudio observacional, descriptivo y transversal. El estudio incluyó a 151 sujetos adultos mayores de 18 años, ambulatorios: 65 pacientes con LES según criterio SLICC 2012 [mediana de la edad: 31 años (22-40), mujeres: 88 %] y 86 sujetos control [mediana de la edad: 30 años (25-39), mujeres: 60%]. El estudio fue aprobado por los respectivos Comités de Ética de los hospitales participantes: Hospital de Infecciosas "Dr. Francisco Javier Muñiz" y Hospital Gral. de Agudos "Dr. J. M Ramos Mejía" y realizado de acuerdo a las normas éticas de la declaración de Helsinki 1975 y las normativas nacionales vigentes. Todos los pacientes y controles proporcionaron su consentimiento informado por escrito.

La actividad de la enfermedad se evaluó utilizando el llamado Índice de actividad del LES (SLEDAI según sus siglas en inglés). Se registraron además las siguientes variables: sexo, edad, presencia y número de crisis lúpicas, índice de daño acumulado (SLICC), presencia de criterios acumulados: daño renal clínico e histopatológico, manifestaciones neurológicas y cutáneas agudas y/o crónicas, presencia de anemia hemolítica, sinovitis, serositis, y ulceras orales y/o nasales. También se registraron marcadores de daño renal como nefritis activa, proteinuria y sedimento urinario patológico.

El 95% de los pacientes estudiados recibían tratamiento con hidroxicloroquina y el 52% con prednisona en forma concomitante. Solo un 5% no estaba bajo tratamiento al momento de ser estudiado.

Estudios de laboratorio.

A todos los pacientes se les extrajo una única muestra de sangre por punción venosa en: 1) tubos con citrato de sodio 3,13% (relación 9:1) destinado para la determinación de ADNlc y 2) tubos con EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) destinado para las técnicas de biología molecular. Todas las muestras fueron conservadas a -40°C hasta su utilización.

Cuantificación de la concentración de ADNlc.

El contenido de ADNlc se cuantificó en un fluorómetro, mediante tinción con el colorante QuantiFluor® dsDNA200X, en base a una curva de calibración realizada con ADN de concentración conocida.

Genotipificación de SNPs Q222R en la ADNasa I (rs1053874).

Se analizó mediante la técnica de PCR-RFLP. A partir de ADN genómico se realizó una PCR utilizando primers específicos. La amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl conteniendo buffer (Tris–HCl 10 mM, pH 8,8, KCl 50 mM, Nonidet P40 (0,08% v/v), MgCl2 3 mM, primers 1 µM, dNTPs 0,2 mM, 2 µg de ADN y 1,25 Unidades de Taq DNA polimerasa. La PCR se llevó a cabo mediante una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación de 45 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de annealing a la temperatura correspondiente según el par de primers empleado y una extensión de 1 minuto a 72°C, seguido de una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de amplificación fueron digeridos con la enzima de restricción correspondiente (Fermentas) en el buffer adecuado durante 3 hs a 37°C. Los productos de la digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% y visualizados por tinción con saber safe®. Para el SNP Q222R (A por G), la presencia del alelo G anula un sitio de corte para la enzima StyI, dando lugar a una única banda de 633 pb, mientras que en presencia del alelo A la digestión con StyI da origen a 2 fragmentos de 422 y 196pb.

Análisis estadístico.

Se realizó el análisis estadístico utilizando el paquete estadístico SPSS (versión 23.0 para Windows SPSS, Chicago, IL, EE. UU.). Debido a que los datos no se distribuyeron normalmente, se presentan como medianas y las variables categóricas como frecuencias y porcentajes. Se utilizaron pruebas no paramétricas (U-Mann-Whitney) para comparar los datos cuantitativos y se utilizó la prueba de Chi cuadrado para comparar proporciones. Se consideró estadísticamente significativa una $p<0.05$.

RESULTADOS

La mediana de la concentración DNAlc en el grupo de LES fue de 1.24 ng/ul (1.08-1.50), significativamente más alta que la observada en el grupo de control: 1.00 ng/ul (0.92-1.06), $p<0.005$, test de Mann-Whitney (Figura 1). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) al comparar las medianas de las concentraciones de DNAlc cuando se dividieron a los pacientes en función de la presencia de nefritis activa o de otros marcadores de actividad renal como proteinuria y la presencia de un sedimento urinario patológico (Tabla 1).

Por otra parte, al analizar el grupo LES según la presencia o no de los criterios acumulados tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ADNlc (Tabla 2). Estos tampoco mostraron asociación con el SLEDAI (Tabla 3), el SLICC de los pacientes o el número de crisis lúpicas registradas.

La Tabla 4 muestra la distribución del genotipo Q222R de la DNasa I y sus frecuencias alélicas en el grupo LES y controles sanos. No se encontraron asociaciones genéticas significativas entre el polimorfismo de DNasa I y el riesgo de LES (p=0.79), aun analizando bajo un modelo de herencia dominante o recesiva (p=0.717 y p=0.863 respectivamente, Chi cuadrado). Por otra parte, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo y nefropatía lúpica. Tampoco observamos ninguna otra influencia significativa del polimorfismo Q222R con las demás características clínicas y bioquímicas registradas.

Se observó que los niveles de ADNlc no mostraron asociación con ninguno de los genotipos posibles del polimorfismo Q222R de la ADNasa I (p>0.50).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Discusión.

En los últimos años y con el perfeccionamiento de las técnicas para la detección ADNlc mucho se ha publicado acerca de la potencial utilidad de este marcador como una herramienta no invasiva y de fácil implementación en los pacientes lúpicos, para detectar daño de órganos, particularmente glomerulonefritis lúpica y otras complicaciones clínicas.

En nuestro estudio, de diseño transversal, observamos que los niveles de ADNlc eran significativamente más elevados en los pacientes con lupus en comparación con los controles que no tenían antecedentes de LES u otras afecciones inflamatorias. No obstante, no logramos demostrar que estos niveles elevados de ADNlc estuvieran específicamente asociados a la actividad de la enfermedad o, en particular, a la glomerulonefritis lúpica u otras manifestaciones clínicas específicas, lo cual concuerda con los resultados de otros grupos de investigación[11,20-24]. Es importante mencionar que otros estudios si han encontrado que las concentraciones plasmáticas elevadas de ADNlc estaban asociadas con nefritis lúpica activa, y que este hallazgo podría deberse a una regulación anormal de las NETs en estos pacientes[18].

La discrepancia entre los resultados de los diferentes estudios podría explicarse por varias causas. En primer lugar, las características de la cohorte estudiada, el tamaño de la muestra, el grado de compromiso clínico de los pacientes incluidos y si estaban o no bajo tratamiento médico, entre otras variables.

Los niveles de ADNlc dependen del equilibrio dinámico entre la producción y el depuramiento del mismo[19]. En nuestro estudio los pacientes incluidos estaban siendo tratados con hidroxicloroquina en su gran mayoría, esta droga inhibe la NETosis a concentraciones fisiológicas. Esto podría explicar por qué los niveles de ADNlc no pudieron diferenciar entre los grupos de riesgo. Por otro lado, a pesar de los avances en las técnicas de detección de ADNlc, es importante destacar que aún falta una estandarización internacional para su determinación, especialmente en lo que respecta al manejo preanalítico de las muestras[25,26].

En lo que respecta a la depuración del ADNlc, la DNasa I desempeña un papel clave en la degradación de la cromatina durante procesos como la apoptosis, la necrosis y la NETosis. Se ha observado que ratones deficientes en esta enzima pueden desarrollar un síndrome similar al lupus[27], y la pérdida de su actividad en los pacientes con LES se asocia con inflamación renal progresiva y acumulación de fragmentos de cromatina[28,10]. Además, se ha observado que los pacientes con LES muestran una degradación sérica alterada de NETs mediada por DNasa I[11,29], especialmente durante las exacerbaciones de la enfermedad, situación que se revierte en los períodos de remisión. La degradación defectuosa de NETs en LES tiende a correlacionarse con niveles más altos de autoanticuerpos anti-NETs y anti-dsDNA[29]. Por otro lado, Yasuda et *al.* encontraron que la sustitución de Q222R (A → G) en el gen DNasa I lleva a la síntesis de una enzima con actividad *in vitro* reducida[30], lo que, junto con la evidencia existente, despertó nuestro interés en estudiar esta variante genética junto a los niveles de ADNlc.

En nuestro estudio, no encontramos una asociación significativa entre el polimorfismo Q222R de la DNasa I y el desarrollo de nefropatía lúpica o de otras manifestaciones clínicas del LES o con los niveles de ADNlc. Si bien en un trabajo realizado por nuestro grupo sobre una muestra de 156 pacientes con LES y 170 controles sanos, encontramos que la presencia del alelo A del polimorfismo Q222R en el gen de la DNAsa I, no del alelo G, contrariamente a lo descripto, estuvo asociado a un riesgo incrementado de desarrollo de nefropatía y a un peor curso de la enfermedad[31], en este grupo de pacientes no pudimos replicar estos hallazgos. Por otra parte nuestros resultados sugieren que el polimorfismo Q222R no estaría asociado con la susceptibilidad al LES. Sin embargo es importante destacar que, dado que se trata de datos genéticos, el número limitado de pacientes incluidos en la investigación restringe la capacidad de hacer inferencias y un análisis estadístico sólido.

Conclusiones.

A pesar de que el grupo de pacientes con LES, que se encontraba bajo un estricto control médico y tratamiento, mostró niveles elevados de ADNlc en comparación con el grupo de control, estos niveles no resultaron útiles para identificar específicamente a aquellos pacientes que presentaban lesiones tisulares particulares, como la nefritis lúpica, entre otras que se investigaron.

Estos resultados pondrían de manifiesto las limitaciones del ADNlc como posible biomarcador de daño renal e injuria tisular específica en pacientes con LES que están bajo tratamiento médico.

Figura 1: Niveles de ADNlc en grupo control vs grupo de pacientes con LES (p<0.005, Mann-Whitney).

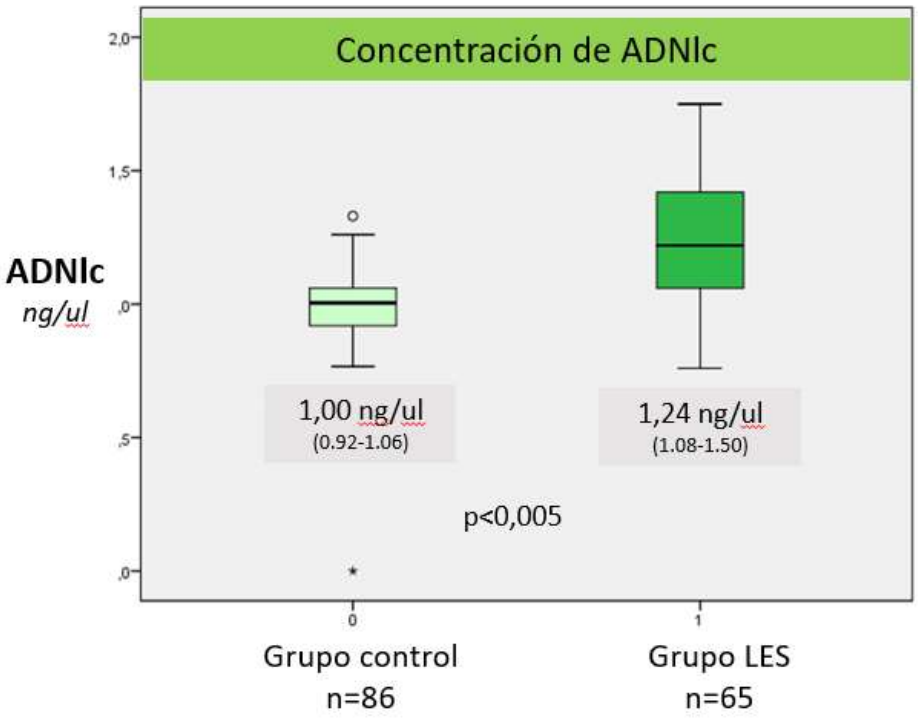


Tabla 1. Niveles de ADNlc según la presencia o no de marcadores de actividad renal:

Niveles ADN libre circulante (ng/ul):	**No**	**Si**	***p***
Proteinuria	1,23 n=54	1,26 n=11	*0,220*
Sedimento urinario patológico	1,23 n=60	1,32 n=5	*0,296*
Nefritis activa	1,23 n=53	1,26 n=12	*0,375*

Tabla 2. Niveles de ADNlc según los diferentes criterios acumulados.

Niveles ADN libre circulante (ng/ul):	**No**	**Si**	***p***
Daño renal	1,20 n=29	1,27 n=36	*0,534*
Manifestaciones neurológicas	1,22 n=51	1,31 n=14	*0,232*
Anemia hemolítica	1,19 n=55	1,23 n=10	*0,851*
Lupus cutáneo agudo/subagudo	1,27 n=21	1,18 n=44	*0,410*
Lupus cutáneo crónico	1,21 n=55	1,30 n=10	*0,260*
Sinovitis	1,22 n=26	1,25 n=39	*0,283*
Serositis	1,21 n=47	1,25 n=18	*0,859*
Ulceras orales y/o nasales	1,15 n=48	1,31 n=17	*0,209*
Alopecia	1,18 n=35	1,25 n=30	*0,234*
Trombocitopenia	1,23 n=57	1,27 n=8	*0,861*
Leucopenia	1,25 n=43	1,21 n=22	*0,345*

Tabla 3. Niveles de ADNlc según los valores de SLEDAI.

SLEDAI		**Niveles DNAlc (ng/ul)**	***p***
			0,495
Inactivo	(n=38)	1,20	
2-3 Leve	(n=16)	1,28	
4-7 Moderado	(n= 4)	1,34	
>8 Grave	(n=7)	1,20	

Tabla 4. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo Q222R de la DNasa I en el grupo LES y controles.

Polimorfismo Q222R	*Pacientes con LES n=65*	*Grupo Control n=75*	*p*
Distribución del genotipo:			
Genotipo AA	11.6 % (n=8)	8 % (n=6)	
Genotipo AG	42.3 % (n=27)	42.7 % (n=32)	0.79
Genotipo GG	46.1 % (n=30)	49.3 % (n=37)	
Distribución alélica:			
Alelo A	0.29	0.33	0.64
Alelo G	0.71	0.67	

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. The New England journal of medicine 2008;358:929-39.
2. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. The New England journal of medicine 2011;365:2110-21.
3. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. Arthritis and rheumatism 1995;38:551-8.
4. Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, Pardo V, Contreras GN. Review: Lupus nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. Lupus 2010;19:557-74.
5. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 2004;303:1532-5.
6. Medina E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. Journal of innate immunity 2009;1:176-80.
7. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. The Journal of experimental medicine 2005;202:1131-9.
8. Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. The Journal of clinical investigation 2005;115:407-17.
9. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. Science translational medicine 2011;3:73ra19.
10. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. Journal of immunology 2011;187:538-52.

11. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010;107:9813-8.

12. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. Nature 2007;449:564-9.

13. Bodano A, Gonzalez A, Balada E, et al. Study of DNASE I gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus susceptibility. Annals of the rheumatic diseases 2007;66:560-1.

14. Bodano A, Gonzalez A, Ferreiros-Vidal I, et al. Association of a non-synonymous single-nucleotide polymorphism of DNASEI with SLE susceptibility. Rheumatology 2006;45:819-23.

15. Shin HD, Park BL, Kim LH, Lee HS, Kim TY, Bae SC. Common DNase I polymorphism associated with autoantibody production among systemic lupus erythematosus patients. Human molecular genetics 2004;13:2343-50.

16. Yasuda T, Nadano D, Takeshita H, et al. The molecular basis for genetic polymorphism of human deoxyribonuclease I: identification of the nucleotide substitution that generates the fourth allele. FEBS letters 1995;359:211-4.

17. Ueki M, Kimura-Kataoka K, Fujihara J, et al. Evaluation of the functional effects of genetic variantsmissense and nonsense SNPs, indels and copy number variationsin the gene encoding human deoxyribonuclease I potentially implicated in autoimmunity. Scientific reports 2019;9:13660.

18. Zhang S, Lu X, Shu X, et al. Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. Internal medicine 2014;53:2763-71.

19. van der Vaart M, Pretorius PJ. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. Annals of the New York Academy of Sciences 2008;1137:18-26.

20. Raptis L, Menard HA. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. The Journal of clinical investigation 1980;66:1391-9.

21. Chen JA, Meister S, Urbonaviciute V, et al. Sensitive detection of plasma/serum DNA in patients with systemic lupus erythematosus. Autoimmunity 2007;40:307-10.

22. Bartoloni E, Ludovini V, Alunno A, et al. Increased levels of circulating DNA in patients with systemic autoimmune diseases: A possible marker of disease activity in Sjogren's syndrome. Lupus 2011;20:928-35.

23. Cepika AM, Soldo Juresa D, Morovic Vergles J, et al. Decrease in circulating DNA, IL-10 and BAFF levels in newly-diagnosed SLE patients after corticosteroid and chloroquine treatment. Cellular immunology 2012;276:196-203.

24. Tug S, Helmig S, Menke J, et al. Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients. Cellular immunology 2014;292:32-9.

25. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the

literature. Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society 2018;93:1649-83.

26. Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. Clinical chemistry 2019;65:623-33.
27. Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz HG, Moroy T. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. Nature genetics 2000;25:177-81.
28. Yu Y, Su K. Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus. Journal of clinical & cellular immunology 2013;4.
29. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. Journal of immunology 2012;188:3522-31.
30. Yasuda T, Ueki M, Takeshita H, et al. A biochemical and genetic study on all non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the gene encoding human deoxyribonuclease I potentially relevant to autoimmunity. The international journal of biochemistry & cell biology 2010;42:1216-25.
31. Camicia G, Munoz SA, Allievi A, et al. Association between severe disease course and nephritis with Q222R polymorphism in DNAse I gene among lupus patients: An Argentine multicenter study. Acta reumatologica portuguesa 2016;41:138-44.

ABSTRACT

Introduction: Systemic Lupus Erythematosus (SLE) patients show increased release of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) with a decrease of its clearance, mainly due to reduced activity of the human enzyme DNaseI. This reduced enzyme activity could be due to a genetic variant known as Q222R polymorphism (rs1053874; +2373A→G).

The result is increased levels of NETs, responsible for endothelial cells and tissue damage and complications such as lupus nephritis. These residual NETs explain the presence of circulating free DNA (cfDNA) in these patients.

Aims: To assess whether there is a correlation between the level of plasma cfDNA and the Q222R genetic variation of human DNaseI in the development of lupus nephritis and other clinical complications

Materials and Methods: The study included 65 patients with SLE according to SLICC 2012 criteria and 86 controls. Clinical and demographic variables were recorded. 95% of the patients received immunomodulatory treatment.

Results: The study showed a significant difference in median cfDNA concentrations between SLE/control groups [1.24ng/µl vs. 1.00ng/µl, $p<0.005$]. Further analysis of subgroups of SLE patients according to the presence of active nephritis, proteinuria, pathological urine sediment, or cumulative criteria showed no significant differences in cfDNA concentrations ($p>0.05$).

Regarding genetic associations, no significant correlation was found between the Q222R polymorphism of DNaseI and susceptibility to SLE ($p=0.79$), development of lupus nephritis, or any of the other clinical/biochemical variables analyzed. Furthermore,

cfDNA levels showed no correlation with any of the possible genotypes of the Q222R polymorphism of DNaseI.

Conclusions: Although the group of SLE patients under strict medical control and treatment had elevated cfDNA levels compared to the control group, these levels were not useful to specifically identify patients with specific lesions, such as lupus nephritis. Our results highlight the limitations of ctDNA as a potential biomarker for identifying of specific tissue damage in treated SLE patients.

MORFOFUNCIONALIDAD TÍMICA Y RESULTADOS DEL TRASPLANTE HEPÁTICO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS SOMETIDOS A DIFERENTES ESQUEMAS DE INMUNOSUPRESIÓN

Ana Rosa Pérez

Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario.
IDICER - CONICET - UNR

OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivo General.

Valorar la potencial influencia de la terapia inmunosupresora sobre la funcionalidad tímica en pacientes pediátricos sometidos a trasplante hepático (TH).

Objetivos Específicos.

El presente proyecto involucra tres cuestiones a ser investigadas. Por un lado, el "éxito" del trasplante en relación con los diferentes regímenes terapéuticos inmunosupresores instituidos. Por el otro, la repercusión de estos tratamientos sobre la glándula tímica, y finalmente, la relación de los cambios tímicos con los resultados del trasplante. Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar si existen diferencias según las terapias instituidas tras la intervención quirúrgica (TH), sobre la existencia de fenómenos de reactividad humoral hacia estructuras del injerto y episodios infecciosos durante el primer año del seguimiento.
2. Analizar la influencia de la terapia inmunosupresora sobre la morfología y funcionalidad del timo (evaluaciones en el pre-trasplante inmediato y a los 3, 6 y 12 meses post-TH) en los pacientes trasplantados a través de la medición en sangre periférica de los TRECS y la morfología de la glándula tímica por ultrasonido.
3. Determinar si existe una relación entre los cambios tímicos y los siguientes fenómenos.

– Aceptación del injerto (ausencia de rechazo a 6 y 12 meses post-TH).
– Eventos infecciosos sufridos por el paciente.
– Fenómenos de reactividad humoral.

RESULTADOS DEL ESTUDIO OBTENIDOS HASTA EL MOMENTO

Los pacientes sometidos a TH se encontraron bajo la supervisión del Dr. Costaguta (Jefe de la Unidad de Hígado y Trasplante Hepático del Sanatorio de Niños de Rosario) en el Sanatorio de Niños de Rosario. Para llevar adelante el objetivo 1, se contó con el apoyo de dos centros de trasplante, la Fundación Favaloro y el Hospital Sainte-Justine de Canadá. En todos los casos, se obtuvieron los consentimientos informados de todos los pacientes y/o tutores.

En relación al objetivo 1:

Al momento de recibir el aloinjerto el receptor debe ser sometido a una inmunosupresión intensa, que incluye el uso de glucocorticoides (GC) y otros tipos de inmunosupresores, si bien se apunta a reducir al mínimo posible el uso de GC [Codoner-Franch et al 1994]. En algunos casos, esto se asocia a una menor frecuencia de enfermedades virales, y mayor supervivencia del injerto libre de rechazo después de 3 años (72% para el tratamiento con tacrolimus-basiliximab vs. 41% con tacrolimus-esteroides) [Gras et al 2008; Reding et al 2003]. Varios estudios prospectivos y retrospectivos con esteroides durante un corto plazo o terapias completamente libres de los mismos han demostrado una tasa de rechazo similar o disminuida con respecto al esquema clásico de esteroides a largo plazo. Los regímenes sin esteroides más habituales se basan en un período de inducción con basiliximab, seguido de tacrolimus o sirolimus como las principales terapias para el mantenimiento, o bien alemtuzumab [Miloh et al 2017]. Es notable, sin embargo, la ausencia de datos comparativos para pacientes de nuestra región sometidos a diferentes esquemas inmunosupresores y su impacto sobre la aceptación de trasplante hepático (TH).

Para ello se realizó un estudio retrospectivo durante el primer año post-TH, de los últimos 5 años (anteriores a 2019), procedentes de distintos centros de trasplante que accedieron a colaborar en este estudio (Hospital de Niños de Rosario, Fundación Favaloro de CABA y el Hospital Sainte-Justine, Toronto, Canadá). Se revisaron las historias clínicas informatizadas de cada paciente (datos demográficos, esquemas de inmunosupresión, episodios de infección/rechazo, parámetros bioquímicos, etc.). Los episodios infecciosos fueron documentados mediante cultivos, pruebas de biología molecular, o sospecha clínica sin aislamiento de gérmenes pero que recibieron tratamiento con ATB endovenoso. Los eventos de rechazo fueron confirmados por biopsia, clínica y laboratorios bioquímicos.

Se compararon 3 esquemas de inmunosupresión:

A. Inducción con basiliximab (BAS)+metilprednisona(PRED) +tacrolimus (TAC).
B. Inducción con timoglobulina (ATG)+BAS+PRED+TAC.
C. Sin inducción, PRED+TAC.

Se incorporaron al estudio un total de 26 pacientes con el tratamiento A, 16 pacientes con el tratamiento B y 6 pacientes con el tratamiento C, todos con diagnóstico de atresia biliar. Se evaluaron las siguientes variables de impacto: “Hígado sin evidencia de rechazo” y “paciente sin evidencia de infección”, en ambos casos al año post-TH.

Luego de un año de seguimiento post-TH, no se observaron diferencias en el número de eventos de rechazo entre los 3 esquemas de inmunosupresión (p:0.64; X^2 test). Tampoco se observaron diferencias en la frecuencia de infecciones (cualquiera sea) entre los 3 esquemas (p:0.30; X^2 test). Sin embargo, sí se observó una diferencia significativa en la frecuencia de infecciones causadas por citomegalovirus (CMV) entre los tratamientos B y C, donde 9/16 pacientes con el tratamiento B fueron positivos para CMV, mientras que ninguno bajo el tratamiento C (p=0.04, test exacto de Fisher).

En relación al objetivo 2:

Aproximadamente el 50% de los TH efectuados en la población pediátrica se realiza durante los primeros 2 años de vida del paciente [De la Rosa et al, 2015]. Esta edad coincide con una etapa donde la función tímica es muy intensa y por lo tanto podría tener un impacto sustantivo sobre dicha función, como en lo que hace al desarrollo de tolerancia, dado que las células T reguladoras son muy dependientes de la presencia de IL-2 (que se halla bloqueada por la inmunosupresión) para su supervivencia y expansión clonal [Spolski et al, 2018]. Sin embargo, la actividad tímica es muy evidente hasta alrededor de los 20 años de edad, período tras el cual la glándula comienza a atrofiarse debido a la edad, proceso denominado involución tímica [Liang et al , 2022]. En el estudio realizado por nuestro grupo, sólo 3 pacientes eran menores de 2 años de edad, con una media de 7,33 años. Al momento de este informe se han incorporado al seguimiento 9 pacientes (si bien el número incorporado al estudio fue mayor, algunos de ellos fallecieron), de los cuales la mayoría aún no ha finalizado el seguimiento **(Tabla 1)**. El tratamiento instaurado en todos los casos consistió en la inducción con basiliximab (BAS)+metilprednisona(PRED) +tacrolimus (TAC).

Tabla 1:

			Tiempo de toma de la muestra				
Paciente	Edad	Sexo	Pre-trasplante	1 mes	3 meses	6 meses	1 año
1	2	F					
2	9	M					
3	6	M					
3							
4	16	M					
5	4	F					
6	10	M					
7	16	M					
7							
8	2	M					
9	1	M					

	Sin muestra
	Sólo TRECs
	TRECs + ETR
	Muestras por tomar
	Pacientes re-trasplantados

Los círculos de escisión del receptor de células T (*TREC,* por sus siglas en inglés), son círculos de ADN episomal que se liberan durante los reordenamientos de las cadenas del receptor de células T que ocurre durante la maduración de los linfocitos en el timo. Por esta razón se utilizan para evaluar la frecuencia de los emigrantes recientes de la glándula y constituyen un marcador subrogado confiable de la función tímica actual. Si bien los *TREC* disminuyen marcadamente con la edad, aún se puede detectar cierto nivel de *TREC* incluso en personas ancianas [Geenen et al, 2003; Steffens et la 2000].

Como puede observarse en la **Figura 1**, la dinámica de los TRECs varió entre pacientes sometidos a TH, siendo evidente en la mayoría de ellos que de 1 a 3 meses post-trasplante se evidencia una caída significativa en el nivel de TRECs, que tiende a restablecerse luego de 6 meses y 1 año post-trasplante.

Las ultrasonografías tímicas se pudieron realizar pre y post trasplante en 5 pacientes [Mendelson, 2001]. En los 5 se evidenció una disminución marcada del tamaño tímico. Dos casos se muestran en la **Figura 2**, donde en coincidencia con lo reportado en relación a las TRECs, se observa una disminución del volumen de la glándula al mes y a los 3 meses post-TH, con una leve recomposición a los 6 meses post-TH.

Figura 1: Dinámica de TRECs en pacientes pre- y post TH, a distintos tiempos post-TH.

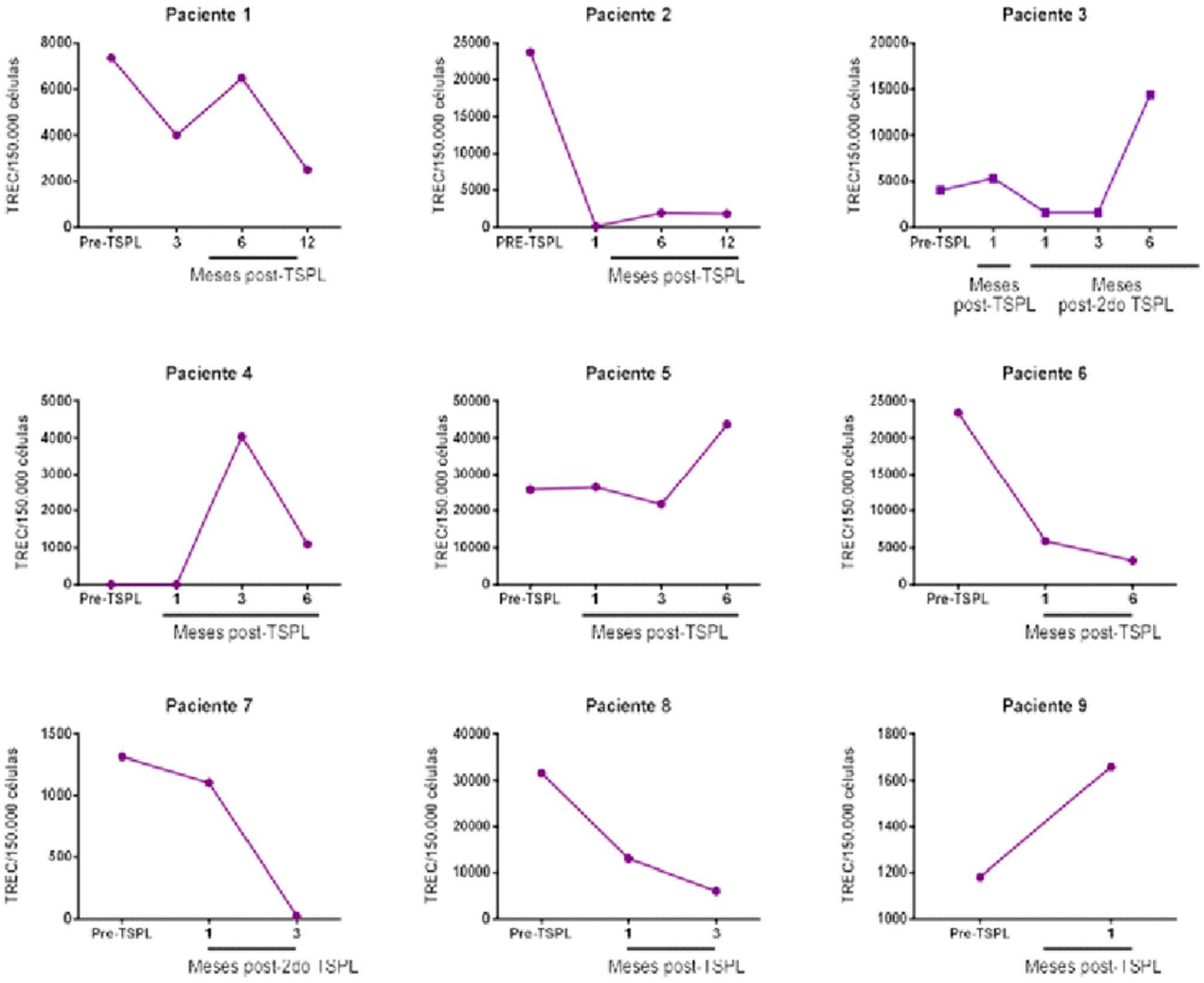
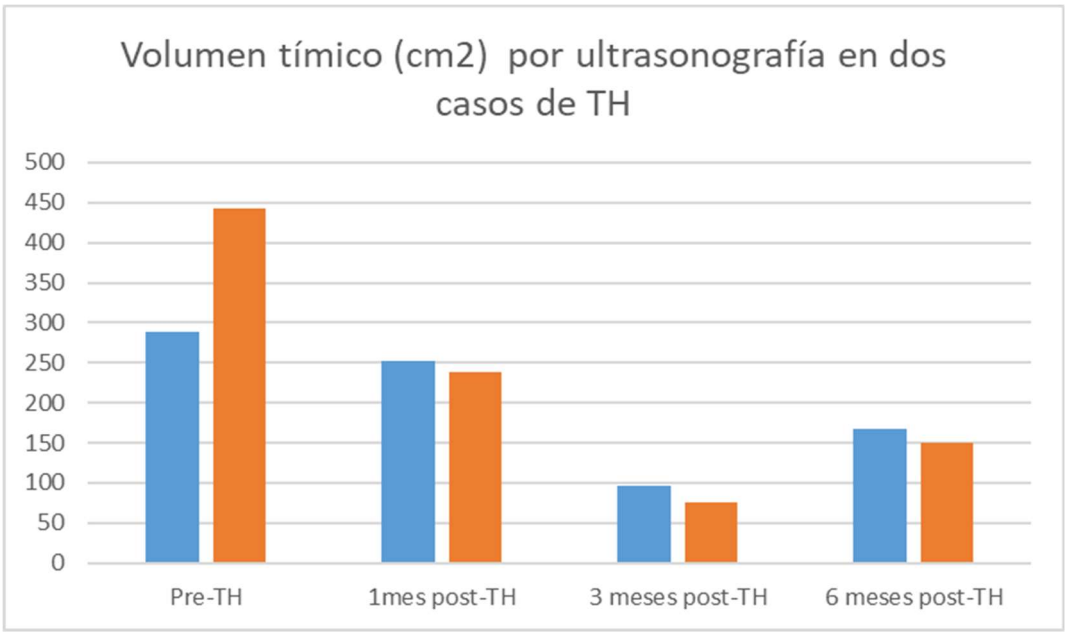


Figura 2: Seguimiento del volumen tímico en dos casos de pacientes trasplantados por ultrasonografía.



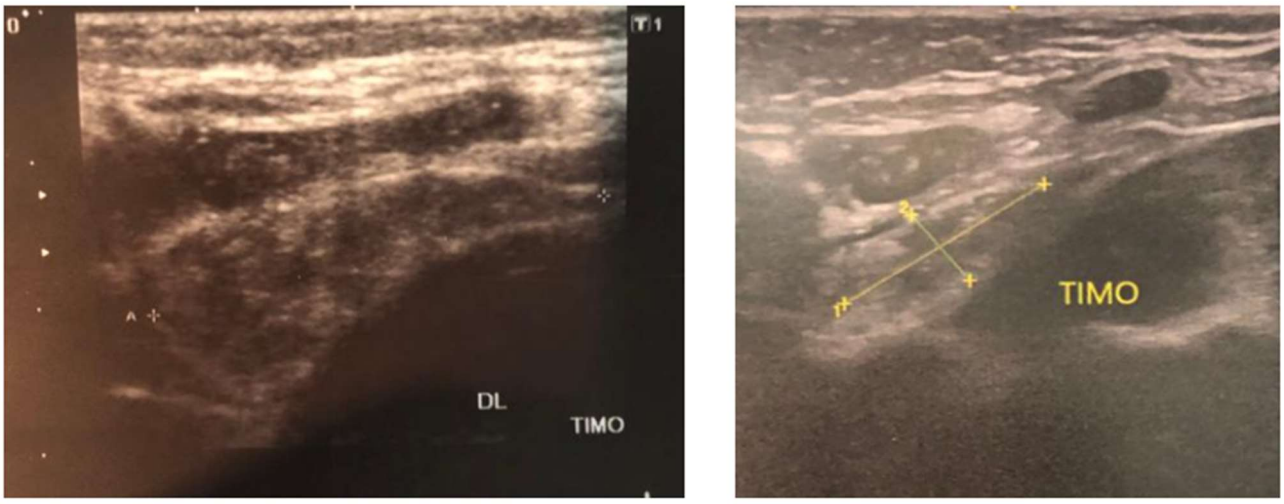


Figura 3: Imagen representativa de ultrasonografía tímica correspondiente a las evaluaciones pre-TH (izquierda) y 3 meses post-TH de un paciente (derecha). El volumen de la glándula se calcula en base al diámetro longitudinal (DL) por diámetro anteroposterior (DAP). En la imagen de la izquierda pueden observarse tanto el DL y el DAP señalados en amarillo.

En relación al objetivo 3:

Tal como se mencionó previamente, la afectación tímica debido a la inmunosupresión podría tener severas consecuencias sobre la competencia inmunológica en términos de la exportación tímica y reposición del repertorio en periferia [Lynch 2009]. Por tratarse de un órgano clave en el mantenimiento de una respuesta inmune eficiente, un trastorno en

la función del timo, particularmente a esa edad, probablemente afectará la capacidad del individuo para combatir infecciones y contrarrestar fenómenos de autoinmunidad en el post-TH inmediato y alejado. Dado que aún no se ha completado el seguimiento de todos los pacientes del ítem anterior, actualmente se continúa con la evaluación de los datos que surgen de las historias clínicas, si bien ya se han registrado casos de infecciones y rechazo al TH.

DISCUSIÓN

El impacto potencial que los tratamientos inmunosupresores administrados durante el trasplante pudieran tener sobre la función tímica y el resultado final del órgano trasplantado (aceptación/rechazo) es un tópico que ha recibido poca atención en la literatura [Lynch 2009]. De momento no existen datos en la literatura respecto a lo que puede darse en el contexto del TH, lo cual brinda un campo fértil para la indagación y eventual manipulación, de la interacción timo-injerto hepático, particularmente en el contexto de la edad pediátrica.

Los individuos trasplantados pediátricos tienen un mayor riesgo de infecciones oportunistas y tumores [Knackstedt et al, 2017], dado la inevitable inmunosupresión terapéutica. Los avances en el terreno de la inmunosupresión apuntan a reducir al mínimo el uso de glucocorticoides, debido a sus efectos adversos. Uno de estos efectos, aún no demasiado estudiado en el contexto del TH, se refiere a su impacto previsible sobre el timo y la regeneración de los linfocitos T. Bajo ciertas situaciones fisiológicas y patológicas, el timo sufre una regresión transitoria abrupta, conocida como involución tímica aguda (ITA), generalmente mediada por niveles aumentados de GCs [Savino, 2017].

Los datos obtenidos hasta el momento indican que los tratamientos inmunosupresores indicados en el TH, llevan a una marcada disminución del tamaño de la glándula (evidenciado por ultrasonografía), así como se su funcionalidad (evidenciado por el nivel de TRECs). Asimismo, en algunos pacientes, esta atrofia parece revertirse, si bien no necesariamente esto indica que el repertorio re-establecido sea similar al pre-TH.

Al momento también se desconoce la repercusión eventual que los tratamientos inmunosupresores administrados en trasplantados pudieran tener sobre la aceptación /rechazo del órgano trasplantado. Hasta el momento, 2 pacientes sufrieron complicaciones que llevaron al re-trasplante, mientras que en 2 pacientes hubo signos de rechazo, pero el mismo fue controlado. No se observó hasta el momento una correlación entre los niveles de TRECs y el rechazo, seguramente debido al aún bajo número de casos.

Más allá de su valor intrínseco, los conocimientos que pudieran ganarse con este estudio podrían aportar una información valiosa en términos de promover una mejor aceptación del injerto, evitar la atrofia tímica, como así también mejorar la respuesta anti-infecciosa en el escenario del trasplante hepático durante la infancia. Desde una mirada más integral tales conocimientos también podrían hacerse extensibles al manejo de otro tipo de trasplantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Codoner-Franch P, O Bernard, F Alvarez. Long-term follow-up of growth in height after successful liver transplantation J Pediatr. 1994;124(3):368-73.
- De la Rosa G, Matesanz R. Liver and intestinal transplant in paediatric population. 2015 An Pediatr (Barc) ;83(6):441.e1-8.
- Geenen V, J-F Poulin, M L Dion, H Martens, et al. Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. 2003 J Endocrinol;176(3):305-11.
- Knackstedt ED, Danziger-Isakov L. Infections in pediatric solid-organ transplant recipients. Semin Pediatr Surg. 2017 Aug;26(4):199-205.
- Liang Z, Dong X, Zhang Z, Zhang Q, Zhao Y. Age-related thymic involution: Mechanisms and functional impact Aging Cell . 2022;21(8):e13671.
- Liver Transpl. Gras JM, Gerkens S, Beguin C, Janssen M, Smets F, Otte JB, Sokal E, Reding R. Steroid-free, tacrolimus-basiliximab immunosuppression in pediatric liver transplantation: clinical and pharmacoeconomic study in 50 children. 2008;14(4):469-77.
- Lynch RJ, Platt JL. Escaping from rejection.Transplantation. 2009 Dec 15;88(11):1233-6.
- Mendelson DS. Imaging of the thymus Chest Surg Clin N Am. 2001 May;11(2):269-93.
- Miloh T, Barton A, Wheeler J, Pham Y, Hewitt W, Keegan T, Sanchez C, Bulut P, Goss J. Immunosuppression in pediatric liver transplant recipients: Unique aspects. Liver Transpl. 2017 Feb;23(2):244-256.
- Reding R, Gras J, Sokal E, Otte JB, Davies HFS. Steroid-free liver transplantation in children Lancet. 2003 20;362(9401):2068-70.
- Savino W. Endocrine Immunology of Chagas Disease. Front Horm Res. 2017;48:160-175. doi: 10.1159/000452914.
- Spolski R, Li P, Leonard WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. Nat Rev Immunol. 2018;18(10):648-659.
- Steffens CM, Al-Harthi L, Shott S, Yogev R, Landay A. Evaluation of thymopoiesis using T cell receptor excision circles (TRECs): differential correlation between adult and pediatric TRECs and naïve phenotypes. Clin Immunol. 2000;97(2):95-101.

ABSTRACT

At the time of liver transplantation (LT) in the pediatric population, the recipient is subjected to immunosuppression with glucocorticoids (GC) and other types of immunosuppressants. Despite there is a tendency to decrease the use of GC (to diminish the frequency of viral diseases and to improve the graft survival), there is a lack of comparative data in our region regarding different immunosuppressive regimens and their impact on transplant acceptance.

The thymopoiesis is intense during the childhood, and therefore GC-mediated immunosuppression and other immunosuppressants could have a substantive impact on the gland, in both terms of tolerance as well as the individual's immune competence. Therefore, this project aims to investigate the “success” of the transplant in relation to the different immunosuppressive regimens, the impact of these treatments on the thymus, and the relationship of the thymic changes with LT outcome.

A retrospective study carried out on 3 dissimilar immunosuppressive therapies does not show differences in the safety and effectiveness at least during the first year post-LT. However, the immunosuppressive therapy caused a reduction in the production of T-lymphocytes “de novo” between the first and third month post-LT, while a reduction in thymic size was also seen in practically all patients. Given that the follow-up of all patients included in the study has not yet been completed, it remains to be analyzed whether there is a relationship between thymic changes and graft acceptance, incidence of infections and autoreactivity phenomena. Beyond its intrinsic value, the knowledge that could be gained from this study could provide valuable information in terms of promoting better acceptance of the graft, avoiding thymic atrophy, as well as improving the anti-infective response in the setting of liver transplantation. during childhood. From a more comprehensive perspective, such knowledge could also be extended to the management of other types of transplants.

BASES MOLECULARES DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS: ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE MODIFICADORES PRIMARIOS, SECUNDARIOS Y TERCIARIOS

Karen G. Scheps, Héctor M. Targovnik

Laboratorio de Genética y Biología Molecular. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo. INIGEM - UBA - CONICET

Las hemoglobinopatías son los síndromes monogénicos más comunes: se estima que el 5,2% de la población mundial es portadora de una o más variantes (Modell & Darlison, 2008) y cada año nacen más de 330.000 afectados (Giordano, et al., 2014). En la actualidad, las hemoglobinopatías continúan siendo un reto para los profesionales de la salud, y siguen llevándose a cabo distintas iniciativas para mejorar tanto los diagnósticos como los tratamientos, ya que en la actualidad la única cura definitiva es el trasplante de médula ósea.

La hemoglobinopatía más frecuente a nivel mundial son los síndromes falciformes, consecuencia de la transversión *HBB*:c.20T>A, que da lugar a la formación de la Hb S, por la sustitución de ácido glutámico por valina, en el codón 6 de la β-globina madura. Esta alteración afecta la solubilidad y la cristalización de la Hb en condiciones hipóxicas (Patrinos y Antonarakis 2010). La severidad clínica de los distintos síndromes drepanocíticos correlaciona directamente con la concentración de Hb S en el eritrocito (Forget y Bunn 2013).

Los síndromes talasémicos se caracterizan por la presencia de alteraciones genéticas que determinan la síntesis disminuida o nula de las cadenas de globina. La clasificación molecular de estos cuadros se basa en qué gen o genes se ven afectados, de las familias de genes de α- y β-globina. La severidad está dada principalmente por el grado de desbalance entre las cadenas de tipo α- y tipo no-α-. En el caso de las α-talasemias, la pérdida progresiva de las 4 copias de genes *HBA* agrava el cuadro hasta la presentación de hidropesía fetal por síndrome de Bart por ausencia absoluta de cadenas de α-globina. En el caso de las β-talasemias, existen 2 copias de genes HBB que pueden verse afectadas y pueden llevar a cuadros de severidad intermedia o de mayor gravedad, consecuencia de la hemólisis y la eritropoyesis ineficaz, con la consecuente anemia y sobrecarga de hierro asociada.

Si bien no existen estadísticas confiables de la incidencia y prevalencia real de estos síndromes en la Argentina, los estudios moleculares realizados en nuestro laboratorio, donde son derivadas muestras principalmente del área metropolitana de Buenos Aires principalmente y en menor medida, del interior del país, confirmaron a la β-talasemia (tal) como la hemoglobinopatía más frecuente, con 470 familias diagnosticadas, en segundo lugar α-talasemia (183 familias) y en tercer lugar, los síndromes falciformes (64 familias) y otros cuadros debidos a variantes estructurales (Scheps, & Varela, 2017). Aún deben realizarse mayores esfuerzos para ampliar esta información, llegar a todos los portadores y contribuir al diagnóstico diferencial de estos síndromes, que en ocasiones presentan

síntomas superpuestos, o evolucionan en su presentación, y conllevan diferente gravedad, pronóstico y tratamiento.

Lo esperable, al tratarse de cuadros con una presentación clásica autosómica recesiva, es que los portadores sean clínicamente silentes, mientras que solo individuos que presenten todas las copias del gen alteradas exhiben cuadros severos. No obstante, en el caso de las hemoglobinopatías, aún los portadores presentan anomalías en su hemograma, que pueden estar acompañadas de manifestaciones clínicas y existe un amplio espectro de presentación de cuadros asociados a genotipos homocigotas o dobles heterocigotas.

Las formas graves de β-tal incluyen un espectro de presentaciones clínicas, desde talasemia dependiente de transfusiones (TDT), los pacientes clásicamente clasificados como β-tal mayor, hasta pacientes que no necesitan transfusiones regularmente pero presentan manifestaciones clínicas, tradicionalmente denominados tal intermedia. Las bases moleculares de estos síndromes son variantes de secuencia en el gen *HBB*, los modificadores primarios, que impiden completamente (β0) o atenúan (β+) la expresión de cadenas de β-globina. En la mayoría de los casos, ambos alelos se ven afectados, aunque existen algunas formas dominantes de tal, debido a variantes inestables que evitan la formación de dímeros αβ y conducen a la precipitación de las cadenas de globina α y β (Cao & Galanello, 2010). También existen modificadores secundarios que pueden alterar el desequilibrio de la cadena de globina α:no-α responsable de la fisiopatología de estos síndromes y modificar el curso clínico (Galanello, et al., 2011). Esto conduce a pacientes que presentan el mismo genotipo *HBB* pero muestran diferentes cursos clínicos. Comprender el papel que juegan estos modificadores podría mejorar el manejo clínico de estos pacientes.

Los modificadores mejor caracterizados son, por un lado, la variación del número de cadenas de α-globina libres debido a un número alterado de copias de genes HBA (Galanello, et al., 2011), o variantes que puede afectar el plegamiento de las cadenas de α-globina al interferir en la interacción con su chaperona particular, AHSP, lo que también puede conducir a su precipitación prematura (dos Santos, & Costa, 2005), y por otro lado, los niveles de Hb F, como se observa en pacientes con persistencia de hemoglobina fetal (HPFH). Como las cadenas γ son capaces de unirse a las cadenas de globina α libres, pueden reducir parcialmente el desequilibrio, atenuando así el curso clínico de la patología. Los *genome-wide association studies* (GWAS) realizados en poblaciones sanas y afectadas con enfermedad de células falciformes y β-tal revelaron los principales *loci* de rasgos cuantitativos (QTL) implicados en la variación de los niveles de hemoglobina fetal, que representan del 20 al 50 % de la variación: una variante promotora de *HBG2* (*rs7482144*), la región intergénica *HBS1L-MYB* (HMIP) (6q23.3) que regula la expresión de *MYB* y *BCL11A* (2p16.1) (Galarneau et al., 2010). *MYB* es un factor hematopoyético esencial que actúa como un regulador maestro, ajustando la cinética de maduración eritroide: desempeña un papel fundamental en la coordinación de la expresión génica de la globina, la regulación del ciclo celular y la diferenciación. Estimula positivamente la expresión de KLF1, KLF3 y KLF8, todos los cuales están involucrados en el silenciamiento de *HBG2* y *HBG1*, y actúa como un regulador corriente arriba de TR2 y TR4, los componentes de DRED (Roosjen et al., 2014). BCL11A se une tanto a la región intergénica como al LCR (locus regulatorio del *cluster HBB*), promoviendo interacciones de largo alcance entre el locus regulador y el gen *HBB*, excluyendo los genes codificadores de γ-globina. También participa en el silenciamiento los genes *HBG* mediante el reclutamiento de diferentes factores de transcripción y complejos remodeladores de cromatina, así como con la ADN metiltransferasa DNMT1, implicada en el mantenimiento del silenciamiento de estos genes (Xu et al., 2013).

Sin embargo, estos modificadores bien documentados no pueden explicar la diversidad clínica observada entre los pacientes con hemoglobinopatía (Stephanou, et al., 2019).

Estudios familiares de HPFH pancelular, de herencia mendeliana, confirmaron el papel de secuencias dentro del grupo de globina β, ya que grandes deleciones y variantes en las regiones promotoras de *HBG2* y *HBG1* conducen a este fenotipo (Banan, 2013), y revelaron la participación de el factor de transcripción maestro eritroide KLF1 (Borg, et al., 2010). Otro miembro de la familia de factores de transcripción tipo Krüper, KLF10, se ha asociado con la regulación de *HBG2* y *HBG1* y se ha identificado como un objetivo farmacogenético para una respuesta adecuada al tratamiento con hidroxiurea (Borg, et al., 2012), que fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para síndromes de células falciformes en pacientes adultos (1998) y pediátricos (2017) por su efecto estimulante de la producción de HbF.

Entre los factores adicionales que podrían influir en el resultado clínico de los pacientes afectados se encuentra el grado de estrés oxidativo que experimentan los precursores eritroides. Diferentes estudios revelaron a NFE2L2 (NRF2) como un actor relevante, capaz de actuar no solo atenuando el daño oxidativo sino induciendo la síntesis de GSH, HMOX1 y otras proteínas que participan en la biosíntesis del hemo, facilitando la incorporación de hierro a este grupo protésico y regulando la movilización de hierro libre, pero también cumpliendo un papel de modificador secundario al inducir la expresión de los genes *HBG2* y *HBG1*, tanto aumentando su expresión directamente al unirse a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) en sus regiones promotoras, como promoviendo el silenciamiento de *BCL11A* y *KLF1* por mecanismos epigenéticos (Zhu, et al., 2019).

El objetivo de este trabajo fue analizar las variantes de secuencia de β-globina y los modificadores secundarios en una cohorte de pacientes argentinos con β-talasemia severa, analizar la correlación genotipo-fenotipo y contribuir al conocimiento de las bases moleculares de estos síndromes.

Para ello, se pusieron a punto reacciones basadas en PCR para evidenciar variantes puntuales de secuencia y un método *in-house* basado en PCR en tiempo real y detección con agentes intercalantes para evidenciar la presencia de deleciones en el gen *HBB* por cuantificación relativa.

PACIENTES Y MÉTODOS

PCR en tiempo Real para detectar deleciones en el gen *HBB*.

Se diseñaron primers que abarcan parte del primer exón e intrón de ***HBB*** y como referencia se amplificó *B2M* (Malik, et al., 2009).

Tabla 1: *Primers* utilizados para cuantificación relativa de *HBB*.

qHBB-F	**5'-CAAGGTGAACGTGGATGAAGT-3'**
qHBB-R	**5'-CTCCACATGCCCAGTTTCTATT-3'**
B2M-F	**5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3'**
B2M-R	**5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3'**

Se analizaron por qPCR y detección con el agente intercalante EvaGreen®:

- 9 muestras con una única copia de *HBB* con variantes (δβ)0-siciliana o (δβ)+-Lepore tipificadas por PCR-GAP.
- 21 muestras controles con variantes heterocigotas en *HBB*, verificadas por secuenciación de Sanger.

Análisis de modificadores primarios y secundarios en una cohorte de pacientes argentinos con β-talasemia severa.

El ADN genómico de 63 sujetos (57 no relacionados) provenientes de Servicios de Hematología de Hospitales Públicos de la Ciudad de Buenos Aires y Provincia de Buenos Aires (Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Hospital Profesor Alenadro Posadas y Hospital General de Agudos José María Ramos Mejía) y prácticas privadas, diagnosticados con formas clínicamente relevantes de β-tal (41 β-talasemia intermedia o Tal no dependiente de transfusiones (β-TI); 22 β-Talasemia mayor o Tal dependiente de transfusiones (β-TM)), según lo determinado por sus médicos, se aisló de leucocitos de sangre periférica utilizando el método estándar de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)(Murray & Thompson, 1980).

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito, siguiendo la versión actual de la Declaración de Helsinki, de las personas involucradas en este estudio, y el proyecto de investigación fue aprobado por el comité de bioética institucional.

Se analizaron modificadores primarios (variantes de secuencia que atenúan o anulan la expresión del gen *HBB*). Debido a que las que afectan más frecuente a este gen son puntuales, se amplificó el gen completo *HBB* por Polymerase Chain Reaction (PCR), como se describió en trabajos anteriores de nuestro grupo (Rossetti, et al., 2010) y se secuenció por el método de Sanger automático (Macrogen, Seoul, South Korea). En pacientes con genotipo compatible, se analizó la presencia de deleciones β-tal (por el método desarrollado para este trabajo) o δβ- talasémicas (por PCR-GAP). La variante $\delta\beta^0$-tal siciliana NG_000007.3:g.64336_77738del13403 se analizó con los *primers* diseñados por Viniou, et al. (1994) y las deleciones $\delta\beta^+$-tal que dan lugar a las variantes de Hb Lepore se estudiaron combinando el *primer* HBD-F1 (5'-AACCCTGCTTATCTTAAAC-3'), descripto por Pavlou, et al. (2006) y el *reverse* HBB2-R (5'-ACGATCCTGAGACTTCCACA-3') diseñado por nuestro grupo de trabajo (Rossetti et al., 2010).

Las deleciones α-tal $-\alpha^{3.7}$,$-\alpha^{4.2}$, $-^{MED\ I}$, $-(\alpha)^{20.5}$, $-^{SEA}$, $-^{FIL}$ y $-^{CAL/CAMP}$ fueron analizadas por PCR-GAP (Tan, et al., 2001; Sessa et al., 2010) y la inserción $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3.7}$ se estudió por PCR alelo específica (Wang et al, 2003). La detección de otras deleciones o duplicaciones en el cluster *HBA* se realizó por MLPA (MRC-Holland, Amsterdam, NL) con la "SALSA MLPA probemix P140-B4 HBA".

KLF1 se secuenció en pacientes candidatos en los que el genotipo *HBB* o el análisis del *cluster* de α-globina no pudieron explicar el fenotipo exhibido. El gen se amplificó con los *primers* diseñados por Singleton, et al (2008).

Siete SNVs fueron genotipados en este estudio. Se analizaron seis *loci* previamente descritos como modificadores secundarios: *rs7482144* que mapea en la región promotora de *HBG2* (alelo menor T), *rs1188686* en el segundo intrón de *BCL11A* (alelo menor G), *rs4895441* en la región intergénica *HBS1L-MYB* (alelo menor G)) (Badens, et al. 2011), *rs2071348* en *HBBP1* (alelo menor C)(Giannopoulou, et al., 2012), *rs4296276* en el intrón 1 de *AHSP* (alelo menor A)(dos Santos, et al., 2008) y *rs3191333* en la región 3'UTR de *KLF10* (alelo menor T) (Borg et al., 2012).Se analizó un marcador adicional: *rs77685897*, en la región 3'UTR de *NFE2L2* (alelo menor C).

Los métodos utilizados para genotipificar cada variante de secuencia única (SNV) se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Métodos empleados para analizar SNVs capaces de actuar como modificadores secundarios de β-hemoglobinopatías.

SNV	HGVS nomenclature	Locus	Method	Source
rs7482144	NC_000011.10:g.5254939G>A	*HBG2*	PCR-RFLP with enzyme XmnI	Nemati et. al, 2010
rs2071348	NC_000011.10:g.5242916T>G	*HBBP1*	AS-PCR	Design based on Kerdpoo et al., 2014
rs4895441	NC_000006.12:g.135105435A>G	*HBS1L-MYB*	AS-Real Time PCR	Scheps et al, 2022
rs11886868	NC_000002.12:g.60493111C>T	*BCL11A*	AS-Real Time PCR	Scheps et al, 2022
rs4296276	NC_000016.10:g.31528109G>A	*AHSP*	AS-PCR	Scheps et al, 2022
rs3191333	NC_000008.11:g.102649991G>A	*KLF10*	PCR-RFLP with enzyme BsdeI	Borg, et al., 2012
rs77685897	NC_000002.12:g.177230519A>G	*NFE2L2*	AS-PCR	Scheps et al, 2022

PCR: Polymerase Chain Reaction. RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism. AS: alelo-específica.

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 5 (GraphPhad Prism Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). El equilibrio de Hardy-Weinberg y las frecuencias de genotipo/alelo se evaluaron mediante el test de Fisher. Se calcularon los OR e IC del 95% para las variables categóricas. Los valores de p <0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

PCR en tiempo Real para detectar deleciones en el gen HBB.

Se logró poner a punto la reacción para poder evidenciar deleciones que remuevan el primer exón de HBB.

Las reacciones presentaron una eficiencia de amplificación del 102,9% para *HBB* y 102,4% para *B2M.*

Se analizó la distribución de los valores de ΔCt *target*-control, que presentaron distribuciones normales en los distintos experimentos. La distribución de los valores obtenidos para las muestras con una y dos copias de *HBB* fue estadísticamente significativa (Mann Whitney test, p= 0,0237) (Figura 1).

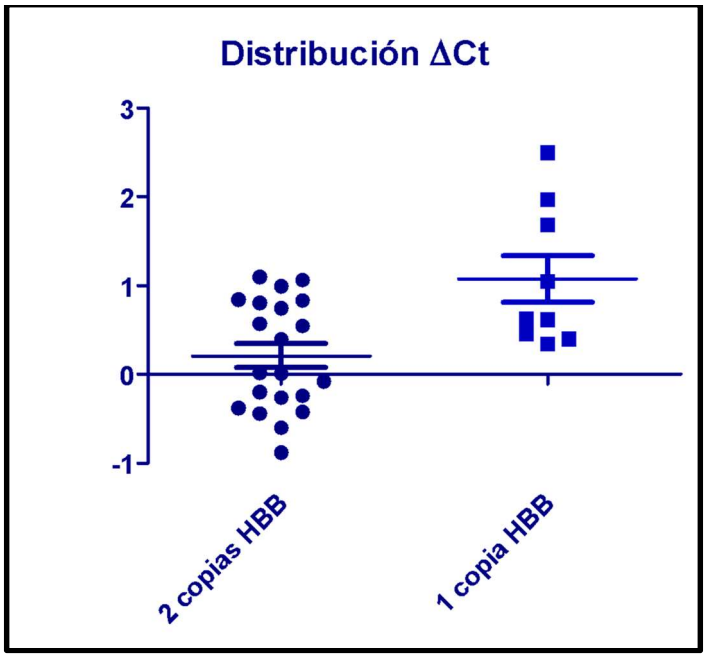


Figura 1: Distribución de ΔCt *target*-control en pacientes con una y dos copias de genes *HBB*

Análisis de modificadores primarios y secundarios en una cohorte de pacientes argentinos con β-talasemia severa.

Los loci *HBB* y *HBA* se analizaron en 63 pacientes (57 familias) con formas graves β-tal. En 42 muestras, el análisis molecular del gen *HBB* y el *cluster* de α-globina reveló genotipos que coincidían con los fenotipos exhibidos (26 TI, 12 TM, 4 tal dominantes). En cuatro pacientes con TI no relacionados se detectaron genotipos que se esperaba, condujeran a cuadros de TM (dos con *HBB*:c.118C>T+/+, uno con *HBB*:c.118C>T/ *HBB*:c.93-21G>A y uno con *HBB*:c.20delA / *HBB*:c.315+1G>A) y, contrariamente, 17 pacientes exhibieron un fenotipo más severo de lo previsto. Este grupo incluyó pacientes que presentaban una combinación de variantes de secuencia β+ o β+/β0 y presentaban TM y pacientes con TI en los que se identificó una variante de secuencia única en *HBB* y no se detectaron alteraciones en los genes *HBA*.

Los genotipos *HBB* y *HBA* identificados y los fenotipos exhibidos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Genotipos de β-tal exhibidos por los pacientes analizados en este estudio con sus respectivos fenotipos esperados/exhibidos.

Variante/s *HBB* Alteración n° copias cluster *HBA*	N° de pacientes	N° de familias	Fenotipo esperado	Fenotipo exhibido
HBB:c.-136C>G / HBB:c.315+1G>A	1	1	β-TI	β-TI
HBB:c.-137C>G / *HBB:c.93-21G>A*	1	1	β-TI	β-TM
HBB:c.-137C>G / *HBB:c.118C>T*	2	2	β-TI	β-TI
HBB:c.20delA / *HBB:c.118C>T*	1	1	β-TM	β-TM
HBB:c.20delA / *HBB:c.315+1G>A*	1	1	β-TM	β-TI
HBB:c.48G>A / *HBB:c.93-21G>A*	1	1	β-TM	β-TM
HBB:c.90 C>T +/+	1	1	β-TI	β-TI
HBB:c.92+1G>A +/-	5	5	β-tal menor	β-TI
HBB:c.92+1G>A / *HBB:c.93-21G>A*	1	1	β-TM	β-TM
HBB:c.92+1G>A / *HBB:c.118C>T*	1	1	β-TM	β-TM
HBB:c.92+1G>A / $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$	1	1	β-TI	β-TI

HBB:c.92+5G>C / HBB:c.92+6T>C	1	1	β-TI	β-TM
HBB:c.92+5G>C / HBB:c.316-106C>G	1**	1	β-TI	β-TM
HBB:c.92+6T>C +/+	3	2	β-TI	β-TI
HBB:c.92+6T>C / HBB:c.93-21G>A	2	2	β-TI	β-TI
HBB:c.92+6T>C / HBB:c.93-21G>A	2	2	β-TI	β-TM
HBB:c.92+6T>C / HBB:c.118C>T	2***	1	β-TI	β-TM
HBB:c.92+6T>C / Hb Lepore	1	1	β-TI	β-TI
HBB:c.93-21G>A +/-	1	1	β-tal menor	β-TI
HBB:c.93-21G>A+/+	2	2	β-TM	β-TM
HBB:c.93-21G>A / HBB:c.118C>T	1	1	β-TM	β-TI
HBB:c.93-21G>A / HBB:c.118C>T	1	1	β-TM	β-TM
HBB:c.93-21G>A / HBB:c.315+1G>A	1	1	β-TM	β-TM
HBB:c.118C>T +/-	3*	3	β-tal menor	β-TI
HBB:c.118C>T +/+	3	3	β-TM	β-TM
HBB:c.118C>T +/+	2	2	β-TM	β-TI
HBB:c.118C>T / HBB:c.+96T>C*	1	1	β-TI	β-TI
HBB:c.118C>T / HBB:c.315+1G>A	1	1	β-TM	β-TM
HBB:c.118C>T / αααα	4***	2	β-TI	β-TI
HBB:c.315+1G>A/ $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$	4**	2	β-TI	β-TI
HBB:c.316-106C>G +/+	1	1	β-TI	β-TM

HBB:c.316-106C>G / ααα$^{anti3.7}$	4	4	β-TI	β-TI
HBB:c.316-106C>G / δβ^{0} variante Siciliana	1	1	β-TI	β-TI
HBB deletion / *ααα$^{anti3.7}$*	1	1	β-TI	β-TI
HBB:c.34_42delGTTAC TGCC (Hb JC-Paz)	1	1	Fenotipo severo, consecuencia de β-tal dominante	β-TI
HBB:c.182_187delTGAA GG (Hb Tavapy)	1	1	Fenotipo severo, consecuencia de β-tal dominante	β-TM
HBB:c.296_297dup (Hb Patagonia)	1***	1	Fenotipo severo, consecuencia de β-tal dominante	β-TI
HBB:c.270_273delTGAG (Hb Wilde)	1**	1	Fenotipo severo, consecuencia de β-tal dominante	β-TM

β-TI: β-talasemia intermedia β-TM: β-talasemia mayor.

*Un paciente con este genotipo exhibió la variante *rs79334031* en estado heterocigota, que se mapea en la región promotora de *KFL1*.

**Tres pacientes (solo uno del grupo *HBB*:c.315+1G>A/ ααα$^{anti3.7}$) presentaban la variante *rs77685897* que mapea en la región 3'UTR de *NFE2L2*, en estado heterocigota.

***Tres pacientes (solo uno del grupo *HBB*:c.118C>T / αααα) exhibieron el SNP *rs4296276* que mapea en una región reguladora de *AHSP*, en estado homocigota. El alelo menor "A" también se detectó en diez pacientes en estado heterocigota.

Dado que las variantes de secuencia en *KLF1* pueden conducir a un amplio espectro de fenotipos (Hariharan, et al., 2019), este gen se secuenció en pacientes en los que el fenotipo difería del esperado. Solo se detectaron cuatro SNVs, tres en la región codificante, consideradas variantes de clase 1, con consecuencias funcionales nulas o menores (Perkins et al., 2016): *rs112631212* (NP_006554.1:p.Met39Leu), *rs2072597* (NP_006554.1:p. Ser102Pro), *rs2072596* (NP_006554.1:p.Phe182Leu). En un paciente con TI en el que solo se identificó la variante de secuencia *HBB*:c.118C>T en estado heterocigota, el análisis de *KLF1* permitió la detección del SNV *rs79334031*.

Se analizaron en los grupos β-TI y β-TM siete SNVs diferentes que mapean en *loci* validados asociados con cursos clínicos menos severos de β-tal. Todas las variantes excepto *rs4296276*, que ejerce un papel regulador de la expresión de *AHSP*, se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). Esta última variante fue analizada en un grupo mayor de 132 individuos no emparentados, y aun así no cumplió con los supuestos de HWE (Prueba Chi-cuadrado, p value = 0.015729) (Scheps, et al., 2018), por lo que no es recomendable realizar asociación estudios. El alelo menor "A" se detectó en diez pacientes en estado heterocigota y en tres en estado homocigota: un paciente con tal intermedia que presentaba la variante *HBB*:c.118C>T y una duplicación del *cluster* de α-globina, un paciente con tal mayor que presentaba genotipo compatible con tal intermedia

(*HBB*:c.92+6T>C / *HBB*:c.118C>T) y en un paciente con una variante dominante (*HBB*:c.296_297dup) que presentó un fenotipo de tal mayor.

De todos los SNV analizados en este estudio, solo el alelo protector G de *rs11886868*, en *BCL11A* mostró una asociación significativa con el fenotipo más leve en nuestra población (valor de p = 0,0341) cuando todas las muestras de los pacientes reclutados para este estudio se incluyeron en el análisis. Sin embargo, la significancia de esta asociación se pierde cuando solo se consideran las muestras en las que ambos alelos *HBB* presentan variantes β-tal (o una dominante en un estado heterocigoto). Aunque no se pudieron validar otras asociaciones en este estudio, cabe destacar que cuando se incluyeron todas las muestras, para *rs7482144*, *rs2071348* y *rs3191333* la tendencia observada se opuso al efecto descrito en la literatura. Esta tendencia se invierte cuando se excluyen del análisis los pacientes con un solo alelo *HBB* con variante patogénica, excepto *rs7482144*. Los resultados del análisis de la prueba exacta de Fisher para los SNV admisibles se muestran en la **Tabla 4** y la **Figura 2**.

Tabla 4: Fisher Exact Test para diferentes modificadores en pacientes con β-TI y β-TM

SNV	Locus	Major/Minor Alelos	MAF[a]	Alelo portector	OR (95% CI)[b]	p-value	OR (95% CI)[c]	p-value
rs7482144	*HBG2*	C/T	0.260	T	2.663 (0.7565 - 9.371)	0.1758	1,129 (0,2754 - 4,629)	1,0000
rs2071348	*HBBP1*	A/C	0.307	C	1.821 (0.5950 - 5.571)	0.3795	0,7368 (0,2148 - 2,528)	0,7545
rs4895441	*HBS1L-MYB*	A/G	0.256	G	0.8889 (0.3443 - 2.295)	1.0000	0,7863 (0,2603 - 2,376)	0,7807

rs11886868	*BCL11A*	C/T	0.349	G	0.3962 (0.1734 - 0.9052)	0.0341 *	0,6000 (0,2247 - 1,602)	0,3325
rs3191333	*KLF10*	C/T	0.353	C	1.680 (0.7365 - 3.832)	0.2329	0,8048 (0,2743 - 2,361)	0,7858

[a]MAF: Minor Allele Frequency. Source: Allele Frequency Aggregator (ALFA) Project[30][b] OR: Odds ratio. CI: Interval of confidence. Calculated with respect to the described protective allele, from all patients in the β-TI and β-TM groups.[c] OR: Odds ratio. CI: Interval of confidence. Calculated with respect to the described protective allele, from the patients in the β-TI and β-TM groups who presented both *HBB* alleles mutated or a dominant variant in a heterozygous state.

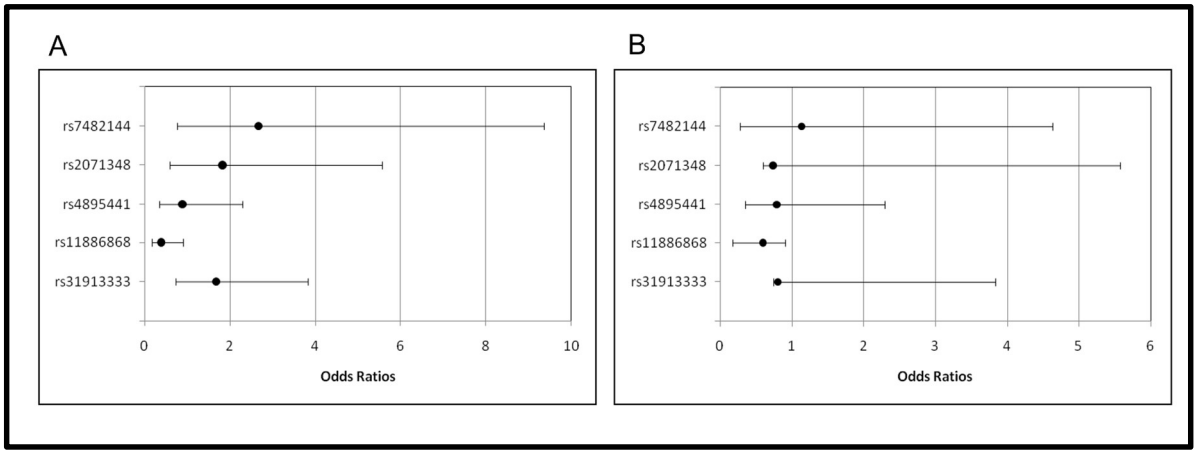


Figura 2: Forest Plot de los modificadores secundarios validados. Se representan gráficamente el Odds Ratio (OR) y los intervalos de confianza del 95% para cada SNV y se calcularon con respecto al alelo protector descrito. Panel A: cálculos considerando todos los pacientes de los grupos β-TI y β-TM. Panel B: cálculo que incluye solo a los pacientes de los grupos β-TI y β-TM que presentaban ambos alelos *HBB* mutados o una variante dominante en estado heterocigota.

Rs77685897 presenta un MAF de 0,00083, por lo que carece de potencia para detectar cualquier asociación. Esta variante se detectó en estado heterocigota en tres pacientes: uno con las variantes *HBB* c.92+5G>C / c.316-106C>G que exhibía un fenotipo de tal mayor, un paciente con la variante dominante *HBB*:c.270_273delTGAG, que se comportó clínicamente como tal mayor y un paciente con tal intermedia y genotipo *HBB*:c.315+1G>A/ $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$ que desarrolló requerimiento transfusional al llegar a la edad adulta.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos ayudan a ampliar el conocimiento sobre las bases moleculares de las hemoglobinopatías en nuestro medio y contribuyen a la caracterización de marcadores con potencial de afectar el curso clínico y posibles *target* terapéuticos en los pacientes afectados.

Se logró poner a punto un método alternativo y accesible para la detección de deleciones que afecten a *HBB* al permitir evidenciar variantes que alteran el número de copias de la región 5' del gen, que puede verse afectada en las β-, $(\delta\beta)^0$- y $(\delta\beta)^+$-talasemias.

Una limitación de este método es que no puede delimitarse la extensión de las mismas. Para ello, debe acoplarse posteriormente otro método, como MLPA.

No obstante, al lograr establecer la presencia de deleciones se facilitará el diagnóstico de los síndromes β-talasémicos en nuestro medio, lo que redunda en beneficio de los pacientes afectados y sus familias. Por medio de este método, y posterior confirmación por MLPA, se pudo corroborar el fenotipo de deleción del gen *HBB* en una paciente con TI, en la que previamente se había detectado el alelo $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$.

La detección del modificador primario por secuenciación de *HBB* o análisis del número de copias, y alteraciones en el número de copias funcionales de *HBA* (que influye directamente sobre el desbalance de cadenas de tipo α:no-α), permitió establecer la correlación entre el genotipo y el fenotipo en 42 de 63 pacientes estudiados. No obstante, un 33% de los pacientes presentaron cursos clínicos que difirieron respecto a los esperado, acorde a sus genotipos: en 18 casos, exhibieron cuadros más severos y 4 pacientes, más leves.

Todos los pacientes que portaban una sola variante de *HBB* y exceso de copias de *HBA* presentaron fenotipo de talasemia intermedia, como era de esperar. Un subgrupo no exhibió características talasémicas en la primera infancia, pero desarrolló la afección entrando en la adolescencia. Asimismo, los resultados obtenidos en esta cohorte reafirman que para desarrollar tal mayor, es necesario que ambas copias de *HBB* presenten variantes recesivas, o esté presente una dominante en un solo alelo.

Los modificadores secundarios al influir sobre el desbalance de cadenas de globina tipo α y no α, pueden influenciar el curso clínico en los pacientes con hemoglobinopatías. Por el momento, los factores mejor caracterizados son la alteración en el número de genes codificantes de α-globina y los niveles de HbF circulante. Este rasgo suele depender tanto

de factores ambientales como genéticos, como variantes que alteran la expresión de los diferentes factores de transcripción que participan en el segundo *switch* del cluster de β-globina (Sanakran & Orkin, 2013). Sin embargo, se ha descrito que ciertas variantes dentro del *cluster* de β-globina y otras que impiden la expresión de *KLF1* pueden conducir a persistencia hereditaria de Hb F de herencia mendeliana.

En nuestro grupo de pacientes que presentaron un fenotipo más leve del esperado, ninguno presentó deleciones α-tal. El valor de la fracción de Hb F solo estuvo disponible en un paciente (82%), lo que ayudaría a explicar el curso clínico observado. La secuenciación de *KLF1* solo mostró la presencia de variantes de clase 1 en estado heterocigota. Sería interesante entender si podrían operar mecanismos alternativos en pacientes que exhiben fenotipos más leves que no presentan deleciones de α-tal o expresión exacerbada de cadenas de globina γ, como una mayor tolerancia al estrés oxidativo o una mayor expresión de chaperonas que pueden unirse el exceso de cadenas de globina α libres, como las proteínas de choque térmico de 70 kDa (Hsp70) (Ribeil, et al., 2007).

Los pacientes que exhiben un fenotipo más severo incluyen dos subgrupos de pacientes: 8 sujetos en los que se encontró una sola variante *HBB* tal recesiva y fenotipo de talasemia intermedia, y 8 pacientes con TM que son compuestos heterocigotas para variantes β-tal y en los que al menos una variante tiene un efecto leve β^+. En este grupo, los pacientes no presentaban un número alterado de genes codificantes de α-globina y el análisis de *KLF1* solo reveló una única variante asociada a HPFH (*rs79334031*, en un paciente con TI y *HBB*:c.118C>T en estado heterocigoto) (Radmilovic, et al., 2013). Se ha demostrado que esta variante inhibe la expresión de *KLF1* in vivo al alterar un sitio de unión de Sp1. El paciente presentó ictericia y eritropoyesis extramedular y fue sometido a una esplenectomía, pero no mostró signos de HPFH. De hecho, un aumento de los niveles de Hb F atenuarían el fenotipo y, en este caso, en función del genotipo y el cuadro clínico exhibido, sería de esperar una segunda variante capaz de aumentar el desequilibrio de las cadenas de α-/no-α-globina. Por el momento, solo hay unos pocos modificadores descritos que pueden aseverar los fenotipos esperados: un mayor número de genes codificadores de globina α, variantes que afectan la estabilidad de las cadenas de α-globina y variantes de *HBB* que puedan generar cadenas de β-globina altamente inestables. En este grupo no se detectaron copias extra de *HBA*, y los pacientes exhibieron variantes de secuencia recesivas reportadas y caracterizadas en la literatura y en diferentes bases de datos HbVar (http://globin.bx.psu.edu/hbvar/me-nu.html) (Patrinos et al., 2004) e Ithanet (http://www.ithanet.eu/) (Kountouris et al., 2014). Una posibilidad es que los pacientes porten variantes en los genes *HBA2* o *HBA1* que conduzcan a variantes inestables o que interfieran con la interacción con AHSP, aunque estas variantes son muy poco frecuentes y, por lo tanto, es poco probable que se encuentren en la mayoría de los pacientes. Por otro lado, se propuso que AHSP podría actuar como modificador secundario (Kong et al., 2004), por lo que se incorporó a nuestro estudio el análisis de la variante *rs4296276*. Aunque esta SNV disminuye la expresión de AHSP y podría afectar el curso clínico de estos síndromes (dos Santos et al., 2008), no terminaría de explicar por qué esta SNV se desvió del equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población. El alelo minoritario se encontró en estado homocigota en tres pacientes que presentaban fenotipos severos, uno de ellos perteneciente a este último grupo, en el que el análisis de los *loci* de β- y α-globina no puede explicar la gravedad observada, y en un paciente con una variante dominante de *HBB* que experimentó un fenotipo de tal mayor.

En la última década ha crecido el interés por la búsqueda de modificadores que puedan alterar el curso clínico de las hemoglobinopatías, con el fin de mejorar los tratamientos y desarrollar terapias personalizadas. Estos estudios evidenciaron el papel de BCL11A, que actualmente es un target de diferentes terapias génicas en desarrollo (Langer & Esrick, 2021), y ayudaron a esclarecer los actores involucrados en los *switch* que coordinan la expresión de los genes que componen el *cluster* de β-globina. Para este trabajo, se seleccionaron cinco SNVs validados en diferentes estudios para estudiar en nuestra población de pacientes con tal intermedia y tal mayor. Como era de esperar, en la mayoría de los casos, dado el pequeño tamaño de la muestra, no fue posible replicar los resultados anteriores en nuestra cohorte. Inicialmente, todos los pacientes fueron incluidos en el análisis y los resultados fueron re-analizados considerando sólo los pacientes que presentaban dos alelos con variantes talasémicas en *HBB*. Con el tamaño de muestra más grande, la asociación del alelo protector "G" de *rs11886868* que mapea en *BCL11A*, fue estadísticamente significativa (aunque con menos potencia estadística que la descrita en estudios con poblaciones más grandes), y aunque la tendencia se mantiene cuando se excluyeron los pacientes con una sola mutación, se pierde la significancia. Para *rs4895441* que mapea en la región intergénica *HBS1L-MYB*, se observó la asociación del alelo protector con el fenotipo más leve, aunque no fue estadísticamente significativa, y esta tendencia se mantuvo en el segundo análisis.

Sorprendentemente, para *rs7482144*, *rs2071348* y *rs3191333*, que mapean en la región promotora de *HBG2*, *HBBP1* y la región 3'UTR de *KLF10*, respectivamente, los resultados del Test de Fisher mostraron la tendencia opuesta a la descrita en la bibliografía (aunque no estadísticamente significativa). Cuando se analizaron las muestras con un solo alelo mutado, esta tendencia se invirtió para *rs2071348* y *rs3191333*. Llama la atención que este efecto no se pudo observar para *rs7482144*, uno de los primeros modificadores caracterizados.

Aún quedan muchos interrogantes por resolver sobre la regulación de la expresión de los genes codificantes de globina y sobre otros factores capaces de alterar la evolución clínica de los pacientes con hemoglobinopatías. De hecho, se están desarrollando iniciativas globales con el fin de profundizar el conocimiento de nuevos modificadores (Kountouris, et al., 2021). Sería interesante explorar el papel de las diferentes chaperonas implicadas en la síntesis de las cadenas de globina y la protección que son capaces de otorgar frente al estrés oxidativo, así como otros factores que pudieran influir en este proceso en progenitores eritroides. La expresión de la respuesta antioxidante en la célula eritroide está orquestada por la expresión del factor NFE2L2 (NRF2), que a su vez estimula la expresión de genes de γ-globina (Li, et al., 2019). Asimismo, si se detecta hipoxia en los tejidos, se induce la producción de HIF-1, que interviene en la respuesta al estrés oxidativo. En consecuencia, decidimos analizar la variante *rs77685897*, que mapea en la región 3' UTR de *NFE2L2* y es un target potencial de hsa-miR-144-3p, que está involucrado en la regulación de *NF2E2*. La baja frecuencia de esta variante, puede ser resultado de un potencial efecto deletéreo, o podría estar subestimada ya que no es capturada para su análisis en muchos estudios de exomas, tal como se refleja en la base de datos gnomAD (https://gnomad.broadinstitute.org /). Se deben realizar análisis adicionales para determinar el papel de esta variante.

Este trabajo espera contribuir al conocimiento de las bases moleculares de la β-talasemia y de los factores que pueden influir en el desenlace clínico de los pacientes.

LOS RESULTADOS DE ESTE TRABAJO FUERON PRESENTADOS EN LAS SIGUIENTES REUNIONES CIENTÍFICAS

- Bioinformatic analyses of KLF1 variants detected in Argentinean population with hemoglobinopathies.

  Héctor M. Targovnik, Karen G. Scheps.

  LXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), 10 a 13 de noviembre de 2020, Reunión Virtual.

  Medicina Buenos Aires, Vol 80. Supl V, Abstract 84 (95), pág. 70, 2020. ISSN 0025-7680. Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

- Caracterización Molecular de β-Talasemia En Argentina.

  Héctor M. Targovnik, Karen G. Scheps.

  Jornadas Argentinas de Genética 2021, 4 a 5 de noviembre de 2021, Reunión Virtual.

- PCR Cuantitativa en Tiempo Real para la Cuantificación de Copias de *HBB*

  Karen G. Scheps, Carolina Pepe, Héctor M. Targovnik.

  L Congreso Argentino de Genética y II Jornadas Regionales SAG-NEA, 2 a 5 de octubre de 2022, Corrientes, Argentina.

PARTE DE LOS RESULTADOS DE ESTE TRABAJO FUERON PUBLICADOS EN LA REVISTA CON REFERATO HUMAN GENE

- Genetic bases and modifiers of β-thalassemia in Argentina.

  Karen G. Scheps, Juan Pablo Salim, Viviana Varela, Nora Basack, Eliana García E, Renée Crisp, Gustavo Chiappe, Silvia, De Paula, Nora Watman, Ana Zerdiew, Héctor M. Targovnik.

  Revista: Human Gene (ISSN: 2773-0441) 2022; 33: 201071.

REFERENCIAS

1. Badens, C., Joly, P., Agouti, I., Thuret, I., Gonnet, K., Fattoum, S., ... & Pissard, S. (2011). Variants in genetic modifiers of β-thalassemia can help to predict the major or intermedia type of the disease. *haematologica*, *96*(11), 1712. https://doi.org/10.3324/haematol.2011.046748.
2. Banan, M. (2013). Hydroxyurea treatment in β-thalassemia patients: to respond or not to respond?. *Annals of hematology*, *92*(3), 289-299. https://doi.org/10.1007/s00277-012-1671-3.
3. Borg, J., Papadopoulos, P., Georgitsi, M., Gutiérrez, L., Grech, G., Fanis, P., ... & Philipsen, S. (2010). Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nature genetics*, *42*(9), 801-805. https://doi.org/10.1038/ng.630.
4. Borg, J., Phylactides, M., Bartsakoulia, M., Tafrali, C., Lederer, C., Felice, A.E., Papachatzopoulou, A., Kourakli, A., Stavrou, E.F., Christou, S. & Hou, J. (2012). KLF10 gene expression is associated with high fetal hemoglobin levels and with

response to hydroxyurea treatment in β-hemoglobinopathy patients. *Pharmacogenomics*, 13(13), pp.1487-1500. https://doi.org/10.2217/pgs.12.125.

5. Cao, A., & Galanello, R. (2010). Beta-thalassemia. *Genetics in medicine*, *12*(2), 61-76.

6. dos Santos, C. O.,& Costa, F. F. (2005). AHSP and β-thalassemia: a possible genetic modifier. *Hematology*, *10*(2), 157-161. https://doi.org/10.1080/10245330500067280.

7. dos Santos, C. O., Zhou, S., Secolin, R., Wang, X., Cunha, A. F., Higgs, D. R., ... & Weiss, M. J. (2008). Population analysis of the alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) gene identifies sequence variants that alter expression and function. *American journal of hematology*, *83*(2), 103-108. https://doi.org/10.1002/ajh.21041.

8. Forget, B. G., & Bunn, H. F. (2013). Classification of the Disorders of Hemoglobin. Cold Spring Harb Perspect Med, 3(2), a011684.

9. Galanello, R., Perseu, L., Satta, S., Demartis, F. R., & Campus, S. (2011). Phenotype-genotype correlation in β-thalassemia. *Thalassemia reports*, *1*(1), 16-20. https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed.

10. Galarneau, G., Palmer, C. D., Sankaran, V. G., Orkin, S. H., Hirschhorn, J. N., & Lettre, G. (2010). Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nature genetics*, *42*(12), 1049-1051. https://doi.org/10.1038/ng.707.

11. Giannopoulou, E., Bartsakoulia, M., Tafrali, C., Kourakli, A., Poulas, K., Stavrou, E. F., ... & Patrinos, G. P. (2012). A single nucleotide polymorphism in the HBBP1 gene in the human β-globin locus is associated with a mild β-thalassemia disease phenotype. *Hemoglobin*, *36*(5), 433-445. https://doi.org/10.3109/03630269.2012.717515.

12. Giordano, P. C., Harteveld, C. L., & Bakker, E. (2014). Genetic epidemiology and preventive healthcare in multiethnic societies: the hemoglobinopathies. *International journal of environmental research and public health*, *11*(6), 6136-6146. https://doi.org/10.3390/ijerph110606136.

13. Hariharan, P., Colah, R., Ghosh, K., & Nadkarni, A. (2019). Differential role of Kruppel like factor 1 (KLF1) gene in red blood cell disorders. *Genomics*, *111*(6), 1771-1776. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.11.032.

14. Higgs, D. R., Aldridge, B. E., Lamb, J., Clegg, J. B., Weatherall, D. J., Hayes, R. J., ... & Serjeant, G. R. (1982). The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. *New England Journal of Medicine*, *306*(24), 1441-1446. https://doi.org/10.1056/NEJM198211183072122.

15. Kerdpoo, S., Limweeraprajak, E., & Tatu, T. (2014). Effect of Swiss-type heterocellular HPFH from Xmn I-G γ and HBBP1 polymorphisms on HbF, HbE, MCV and MCH levels in Thai HbE carriers. *International journal of hematology*, *99*(3), 338-344. https://doi.org/10.1007/s12185-014-1516-z.

16. Kong, Y. I., Zhou, S., Kihm, A. J., Katein, A. M., Yu, X., Gell, D. A., ... & Weiss, M. J. (2004). Loss of α-hemoglobin–stabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates β-thalassemia. *The Journal of clinical investigation*, *114*(10), 1457-1466. https://doi.org/10.1172/JCI21982.

17. Kountouris, P., Lederer, C. W., Fanis, P., Feleki, X., Old, J., & Kleanthous, M. (2014). IthaGenes: an interactive database for haemoglobin variations and epidemiology. *PloS one*, *9*(7), e103020. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103020.

18. Kountouris, P., Stephanou, C., Archer, N. M., Bonifazi, F., Giannuzzi, V., Kuo, K. H., ... & Kleanthous, M. (2021). The International Hemoglobinopathy Research Network (INHERENT): An international initiative to study the role of genetic modifiers in hemoglobinopathies. *Blood*, *138*, 948. https://doi.org/10.1182/blood-2021-146078.

19. Langer, A. L., & Esrick, E. B. (2021). β-Thalassemia: evolving treatment options beyond transfusion and iron chelation. *Hematology*, *2021*(1), 600-606. https://doi.org/10.1182/hematology.2021000313.

20. Li, B., Zhu, X., Ward, C. M., Starlard-Davenport, A., Takezaki, M., Berry, A., ... & Pace, B. S. (2019). MIR-144-mediated NRF2 gene silencing inhibits fetal hemoglobin expression in sickle cell disease. *Experimental hematology*, *70*, 85-96. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.11.002.

21. Malik, A. N., Shahni, R., & Iqbal, M. M. (2009). Increased peripheral blood mitochondrial DNA in type 2 diabetic patients with nephropathy. Diabetes research and clinical practice, 86(2), e22-e24.

22. Modell, B., & Darlison, M. (2008). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization*, *86*, 480-487. https://doi.org/10.2471/blt.06.036673.

23. Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, *8*(19), 4321-4326. https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321.

24. Nemati, H., Rahimi, Z., & Bahrami, G. (2010). The Xmn1 polymorphic site 5′ to the G γ gene and its correlation to the G γ: A γ ratio, age at first blood transfusion and clinical features in β-thalassemia patients from Western Iran. *Molecular biology reports*, *37*(1), 159-164. https://doi.org/10.1007/s11033-009-9566-7.

25. Patrinos, G. P., & Antonarakis, S. E. (2010). Human hemoglobin. In Vogel and Motulsky's Human Genetics (pp. 365-401). Springer Berlin Heidelberg.

26. Patrinos, G. P., Giardine, B., Riemer, C., Miller, W., Chui, D. H., Anagnou, N. P., ... & Hardison, R. C. (2004). Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. *Nucleic acids research*, *32*(suppl_1), D537-D541. https://doi.org/10.1093/nar/gkh006.

27. Pavlou, E., Phylactides, M., Kyrri, A., Kalogerou, E., Makariou, C., Georgiou, I., & Kleanthous, M. (2006). δ-Thalassemia in Cyprus. *Hemoglobin*, *30*(4), 455-462. https://doi.org/10.1080/03630260600868006.

28. Perkins, A., Xu, X., Higgs, D. R., Patrinos, G. P., Arnaud, L., Bieker, J. J., ... & KLF1 Consensus Workgroup. (2016). Krüppeling erythropoiesis: an unexpected broad spectrum of human red blood cell disorders due to KLF1 variants. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *127*(15), 1856-1862. https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-694331.

29. Phan, L., Jin, Y., Zhang, H., Qiang, W., Shekhtman, E., Shao, D., ... & Kattman, B. L. (2020). ALFA: Allele Frequency Aggregator. *National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine*, *10*.

30. Radmilovic, M., Zukic, B., Petrovic, M. S., Bartsakoulia, M., Stankovic, B., Kotur, N., ... & Pavlovic, S. (2013). Functional analysis of a novel KLF1 gene promoter variation associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Annals of hematology*, *92*(1), 53-58. https://doi.org/10.1007/s00277-012-1625-9.

31. Ribeil, J. A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., ... & Hermine, O. (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, *445*(7123), 102-105. https://doi.org/10.1038/nature05378.

32. Roosjen, M., McColl, B., Kao, B., Gearing, L. J., Blewitt, M. E., & Vadolas, J. (2014). Transcriptional regulators Myb and BCL11A interplay with DNA methyltransferase 1 in developmental silencing of embryonic and fetal β-like globin genes. *The FASEB Journal*, *28*(4), 1610-1620. https://doi.org/10.1096/fj.13-242669.

33. Rossetti, L. C., Scheps, K. G., Binaghi, A., Abreu, M. S., Mansilla, M. T., & Varela, V. (2010). Diagnóstico molecular de mutaciones beta talasémicas, genotipos complejos. *Hematología Argentina*, *14*, 41-7. http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol14Vol%2014-2.pdf.

34. Sankaran, V. G., & Orkin, S. H. (2013). The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *3*(1), a011643. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011643.

35. Scheps, K. G., Hasenahuer, M. A., Parisi, G., Targovnik, H. M., García, E., Veber, E. S., ... & Fornasari, M. S. (2018). Two novel unstable hemoglobin variants due to in-frame deletions of key amino acids in the β-globin chain. *European journal of haematology*, *100*(6), 529-535. https://doi.org/10.1111/ejh.13029.

36. Scheps, K. G., & Varela, V. (2017). Bases moleculares de hemoglobinopatías en Argentina. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, *51*(3), 333-342. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572017000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

37. Scheps, K. G., Varela, V., & Targovnik, H. M. (2018). The chaperones involved in hemoglobin synthesis take the spotlight: analysis of AHSP in the argentinean population and review of the literature. *Hemoglobin*, *42*(5-6), 310-314. https://doi.org/10.1080/03630269.2018.1544145.

38. Sessa, R., Puzone, S., Ammirabile, M., Piscopo, C., Pagano, L., Colucci, S., ... & Grosso, M. (2010). Identification and molecular characterization of the--CAMPANIA deletion, a novel α°-thalassemic defect, in two unrelated Italian families. *American journal of hematology*, *85*(2), 143-144. https://doi.org/10.1002/ajh.21591.

39. Singleton, B. K., Burton, N. M., Green, C., Brady, R. L., & Anstee, D. J. (2008). Mutations in EKLF/KLF1 form the molecular basis of the rare blood group In (Lu) phenotype. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *112*(5), 2081-2088. https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-145672.

40. Stephanou, C., Tamana, S., Minaidou, A., Papasavva, P., Kleanthous, M., & Kountouris, P. (2019). Genetic modifiers at the crossroads of personalised medicine for haemoglobinopathies. *Journal of clinical medicine*, *8*(11), 1927. https://doi.org/10.3390/jcm8111927.

41. Tan, A. S. C., Quah, T. C., Low, P. S., & Chong, S. S. (2001). A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for α-thalassemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *98*(1), 250-251. https://doi.org/10.1182/blood.V98.1.250.

42. Viniou, N., Georgiou, J., Loutradi, A., Rombos, J., Fessas, P., & Loukopoulos, D. (1994). Molecular basis and haplotype analysis of delta, beta-thalassemic chromosomes in Greece. *Acta haematologica*, *92*(2), 83-87. https://doi.org/10.1159/000204180.

43. Wang, W., Ma, E. S., Chan, A. Y., Prior, J., Erber, W. N., Chan, L. C., ... & Chong, S. S. (2003). Single-tube multiplex-PCR screen for anti-3.7 and anti-4.2 α-globin gene triplications. *Clinical chemistry*, *49*(10), 1679-1682. https://doi.org/10.1373/49.10.1679.

44. Xu, J., Bauer, D. E., Kerenyi, M. A., Vo, T. D., Hou, S., Hsu, Y. J., ... & Orkin, S. H. (2013). Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by BCL11A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(16), 6518-6523.https://doi.org/10.1073/pnas.1303976110.

45. Zhu, X., Oseghale, A. R., Nicole, L. H., Li, B., & Pace, B. S. (2019). Mechanisms of NRF2 activation to mediate fetal hemoglobin induction and protection against oxidative stress in sickle cell disease. *Experimental Biology and Medicine*, *244*(2), 171-182. https://doi.org/10.1177/1535370219825859.

ABSTRACT

Hemoglobinopathies are still a challenge for health professionals and many efforts are performed to achieve adequate diagnosis and develop novel treatments. The molecular bases of these syndromes are sequence variants in the globin genes, which alter or prevent the expression of the α- and β-globin chains. There are also modifiers that can alter the α:β-globin chain unbalance responsible for the pathophysiology of these syndromes, and modify the clinical course of these syndromes, preventing a correlation between the genotype of the patients and the exhibited phenotypes.

In this work, the α- and β-globin sequence variants and secondary modifiers (*KLF1*, *rs7482144*, *rs11886868*, *rs4895441*, *rs2071348*, rs4296276, *rs3191333* and *rs77685897*) were individually analyzed by several techniques in a cohort of 63 Argentinean patients with severe β-thalassemia.

In 41 samples a genotype-exhibited phenotype correlation was corroborated. *KLF1* analysis in this cohort revealed only one functional variant: *rs79334031*. SNVs associated with modifier loci (*HBG2, HBBP1, HBS1L-MYB, BCL11A, KLF10* and *AHSP)* were analyzed in patients with transfusion-dependent and non-transfusion dependent thalassemia. Only for *rs11886868* in *BCL11A*, the protective allele showed a statistically different distribution in the groups. A variant that maps in a potential target for hsa-miR-144-3p, rs77685897, in the 3' UTR region of NFE2L2 was detected in heterozygous state

in three patients. An in-house method for detecting β-globin gene deletions with Real Time PCR and detection with dsDNA intercalating dye was developed.

The evaluation of the α and β-globin clusters by itself could not explain the genotype-phenotype correlation in 22 patients. The analysis of previously validated modifiers in our population highlighted the protective role of *rs11886868* and revealed the need to further characterize genetic loci that could alter the clinical course of these syndromes.

Keywords: β-thalassemia, modifiers, KLF1, BCL11A, NFE2L2

ANÁLISIS ESPACIOTEMPORAL DE AGRUPAMIENTOS DE SUICIDIOS EN LA LOCALIDAD DE ARRECIFES (PROVINCIA DE BUENOS AIRES - ARGENTINA), DURANTE EL PERIODO DE MARZO 2018 A FEBRERO 2019

Daniel Serrani, Constantino Turri, Karina Castro

Subsecretaría de Determinantes Sociales de la Salud y la Enfermedad Física, Mental y de las Adicciones. Dirección de Prevención de las Adicciones y promoción de la Salud Mental. La Plata, Provincia de Buenos Aires

INTRODUCCIÓN

El término conglomerado o agrupamiento de suicidios se aplica a un conjunto de eventos suicidas que exceden el número esperado en términos de tiempo, lugar o ambos. En general incluye 3 o más eventos suicidas completados en una comunidad o institución específica en un periodo de tiempo limitado, que puede ir desde 2 semanas hasta 3 meses. En ausencia de conexiones sociales evidentes se requiere evidencia de una ligazón espacial y temporal. Si existen vínculos sociales evidentes y robustos entre los casos, solo se requiere para definir el conglomerado la presencia de una vinculación temporal. Existen dos grandes grupos de conglomerados de suicidios, los puntuales y los masivos (Niedzwiedz et al, 2014). Dentro de los primeros encontramos el espacial o geográfico que responde a un exceso de casos de suicidio reportados en un área geográfica determinada y variable en tamaño, desde una localidad hasta un país o región. El conglomerado temporal es un exceso de suicidios próximos dentro de un marco temporal. El conglomerado espacio-temporal se define por un exceso de casos de suicidios agrupados en los cuales hay una interacción entre el escenario espacial y el marco temporal. Se han publicado varios estudios sobre conglomerados puntuales de suicidios que han ocurrido en diferentes lugares y periodos discretos en el mundo (Robertson et al, 2012; Larkin y Beautrais, 2012). A medida que los comportamientos suicidas y eventos completados se diseminan rápidamente por los medios virtuales se espera que un mayor número de suicidios que los esperados ocurrirán en un periodo especifico de tiempo pero en un ámbito geográfico más amplio (conglomerados masivos), haciendo necesario que los departamentos locales de sanidad permanezcan alertas e informen ante la ocurrencia de eventos de suicidio, aun aislados, ya que podrían ser punto de inicio de una cadena de imitación, especialmente en presencia de grupos vulnerables o de riesgo (Daine et al, 2013). Las agrupaciones o conglomerados de suicidios alcanzan al 5-10% del total de casos de suicidio, se torna particularmente frecuente entre adolescentes y adultos mayores (Gould et al, 1990). Con relación a la vinculación de los casos entre sí existen dos alternativas, una que toma en cuenta las razones subyacentes del agrupamiento basada en el modelo de las enfermedades infecto contagiosas (contagio o imitación de suicidios) (Johansson et al, 2006) y otra que considera otras razones subyacentes de la acumulación de casos además de la imitación, como factores sociales, económicos o geográficos (Exeter y Boyle, 2007; Saman et al, 2012). Se han empleado varios métodos estadísticos para la detección de conglomerados de eventos en términos

epidémicos que se pueden dividir en dos grandes grupos: a) método de emparejamiento basado en el cálculo de la distancia entre pares de observaciones; y b) método de celda basado en la distribución de casos en unidades espacio temporales derivadas del área geográfica y momento temporal (Marshall, 1991). Para los dos métodos se asume una hipótesis nula (h0) de distribución aleatoria de casos diagnosticados (ausencia de conglomerados) a ser rechazada mediante el análisis de valores de probabilidad significativos (presencia de conglomerados). El primero en introducir la noción de interacción espacio temporal fue Knox (Knox, 1964) que considera todos los pares posibles de casos y establece para cada par una relación positiva entre distancia espacio-temporales. Si existen casos cercanos en espacio y tiempo (o, la inversa) se establece una evidencia para la agrupación espacio-temporal. Otros autores han extendido este concepto al control de infecciones (Jacquez, 1996), a la detección de aglomeraciones no homogéneas de enfermos (Cuzick y Edwards, 1990), detección de conglomerados en series de tiempo discretas (Lawson, 2000; Glaz, 1993)) o amplias (Grimson et al, 1995; Naus, 1982). Este trabajo tiene como objetivo el estudio de la posible asociación temporal, espacial o espacio-temporal de un conjunto de suicidios ocurridos en el municipio de Arrecifes, uno de los 135 partidos de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) con 30.735 habitantes notificados durante el año 2018. Además, determinar si en base a sus características, se pueden considerar como conglomerados en los términos que definen dicho proceso. Este trabajo se desarrolló a partir de una invitación de las autoridades pertenecientes a la Subsecretaría de Determinantes Sociales de la salud, la Dirección de Salud Mental y la Subsecretaría de Planificación y Contralor Sanitario, a través de la Dirección de Epidemiología, quienes trabajaron en forma conjunta con el Municipio y sus autoridades para evaluar la situación.

OBJETIVO

Determinar si el conjunto de suicidios notificados durante el periodo considerado entre 21/03/2018 y 19/02/2019 en el Municipio de Arrecifes responde a la tipología de conglomerado o cluster. En caso de confirmar dicha tipología, identificar el número de clusters, su composición y las variables que permiten diferenciarlos entre sí. Contribuir al conocimiento de este fenómeno epidemiológico que sigue siendo objeto de controversias en la literatura científica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño.

Descriptivo, cuantitativo.

Población y procedimiento.

Se incluyeron las defunciones por suicidios ocurridas en los meses desde 21/03/2018 al 19/02/2019 en la Municipalidad de Arrecifes. Los datos se obtuvieron de los registros de defunciones de la Municipalidad de Arrecifes, de la Dirección de Información Sistematizada del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires y de las encuestas posvención a familiares de los occisos. Los datos incluyeron edad y sexo de los suicidas, fecha y modalidad del evento. La información obtenida de las encuestas se organizo en base a los siguientes puntos de acuerdo a las guías usuales en autopsias psicológicas:

genograma familiar, situación familiar (familia continente o no) situaciones vitales estresantes que pudieron influir en el acontecimiento (enfermedades, muerte de familiares, abusos infantiles, violencia, dificultades económicas, deudas, falta de trabajo, separaciones o divorcios); el lugar que ocupaba el occiso en su familia (aceptado o rechazado), percepción de su trato por parte de la familia (hostigamiento o ayuda), relaciones con su familia (compartir o no actividades o confidencias), alguien significativo en quien confiar, acontecimientos en la comunidad que pudieron influir en el suicidio; antecedentes de suicidios previos personales o familiares; tratamientos anteriores; conductas extrañas (adicción; juego patológico; depresión; violencia; aislamiento); amistades, actividades deportivas artísticas culturales o religiosas; estudios; situación laboral (trabajo o desocupado) y antecedentes judiciales. Los casos de suicidio se identificaron como cualquier fallecimiento para el que la causa de la muerte correspondió a los códigos X60-X84 de la Clasificación Internacional de Enfermedades 10ª edición. Durante el período analizado se consideró una población total de 30.735 habitantes para la localidad de Arrecifes (INDEC, Censo Nacional de 2010).

Análisis geográfico.

Los casos de suicidio fueron proyectados sobre un mapa de la localidad de Arrecifes empleando el Google Earth (http://www.google.ar/intl/ar/earth/index.html) para determinar las coordenadas de latitud y longitud de la dirección de cada caso de suicidio consumado y se proyectaron sobre un mapa siguiendo un modelo circular WGS84 utilizando el programa ArcGIS v10 (ESRI, Inc, Redlands, CA.) que permitió generar imágenes cartográficas de los puntos urbanos de eventos con esquemas de color generados con el programa ColorBrewer. Los puntos de eventos fueron agrupados en áreas usando el algoritmo de optimización de límites de Jenks (Jenks, 1967).

Análisis estadístico de conglomerados temporales-espaciales.

La detección de agrupaciones o conglomerados de alto riesgo de suicidio locales se llevo a cabo con un modelo estadístico bi-dimensional de permutación espacio temporal usando el programa SaTscan® basado en la creación de ventanas cilíndricas con una base circular que se ajusta automáticamente para compensar diferencias en la densidad geográfica de cada área poblacional. A medida que se desplaza en el espacio define un conjunto de ventanas basado en el número total de casos en el espacio. De este modo cada ventana representa un agrupamiento potencial que rodea el centroide representando el área censal definida. Las ventanas evalúan desde el menor tamaño al máximo y se emplearon los valores de 10%, 20% y 50% de la población para los parámetros bajo examen. Se empleó un modelo discreto de Poisson para comparar el número esperado versus el observado de casos dentro y fuera de cada ventana. La ventana con máxima probabilidad también representa el agrupamiento más probable y menos debido al azar. Se configuró el proceso para permitir la superposición geográfica entre agrupamientos potenciales de modo tal que dos agrupamientos podían incluir el mismo espacio geográfico siempre que el centroide de agrupamiento menos probable no estuviera dentro del área del agrupamiento más probable. De esa manera se posibilita la detección de agrupamientos vecinos que pueden compartir algunos casos de suicidios. Este método resulta adecuado para diferentes distribuciones asumidas bajo la hipótesis nula. En caso de añadir una dimensión temporal a los círculos espaciales, se conforman cilindros de conglomerados espacio-temporales, cuya base es la ventana circular definida previamente y la altura del cilindro es el periodo de tiempo que varía desde 0 hasta el límite superior definido por el investigador de acuerdo con la siguiente notación (Kulldorff, 1997). El proceso fue

implementado en un programa SaTScan v9.1 (http://www.satscan.org). Las ventajas de este sistema derivan de su capacidad para controlar las covariables permitiendo ajustar los resultados a múltiples comparaciones y tamaños de población, y al mismo tiempo limitar el sesgo de preselección al no requerir una especificación a priori del conjunto de casos observados dentro de un agrupamiento (Kulldorff, 1998). Los test de significación se ejecutaron con una simulación Monte Carlo donde la hipótesis nula de no conglomerado se rechaza con $\alpha = .05$ si $p \leq .05$. Un conglomerado de alto riesgo se interpreta como un evento o conjunto de eventos agrupados en una ventana circular con una incidencia significativamente mayor del evento estudiado con respecto a las ventanas de áreas vecinas (Kulldorff, 1995). Para detectar agrupaciones espacio-temporales de suicidio, se empleo la función K de Ripley basada en simulaciones de Monte Carlo y que es suficientemente robusta aun en áreas geográficas pequeñas. se empleo el paquete estadístico Splancs para definir los valores del parámetro R (www.r-project.org). Se generaron tablas de contingencia para la confluencia de combinaciones de 4 períodos de tiempo (1 a 4 semanas) y 4 distancias (0-2,5 km; 2,5-5 km; 5-10 km; y 10-15 km) críticos. Si bien no se dispone actualmente de una definición estandarizada de los límites espaciales para un conglomerado de suicidios, se considera que la ubicación catastral de residencia es una unidad sensible y aceptable (Gould, 1994). Además se investigaron las tendencias temporales de alto riesgo con el programa estadístico de detección temporal de conglomerados. Este modelo emplea una ventana que se desplaza en una dimensión temporal para identificar un periodo cronológico donde el riesgo de suicidio fue mayor comparado con los demás periodos cronológicos. Para este análisis temporal (no espacial) se empleó un modelo de distribución probabilística discreta con un tamaño temporal máximo de conglomerado de 4 semanas. Todos los análisis se ajustaron para distribuciones de edad y género a nivel local. Los conglomerados espaciales se proyectaron cartográficamente por medio del programa ArcGIS v10.

Análisis descriptivos.

Se empleo test de X^2 de Pearson y test t (dos colas) para determinar si las características socio-demográficas y método de comisión empleado por las victimas de suicidio dentro de los agrupamientos exhibían diferencias significativas con respecto a la distribución de datos de nivel nacional. Para estos análisis se utilizó el programa SPSS v.20.

RESULTADOS

Durante el periodo considerado entre 21/03/2018 y 19/02/2019, en Arrecifes (Buenos Aires) un total de 15 individuos cometieron suicidio. La distribución de eventos por año, género y grupo etario se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de eventos durante periodo considerado

	15-24	25-34	35-44	45-54	55-64	65-74	75-84	>85	total
M	3			1	1	2	1	2	10
F			1						1

Tasa suicidio ajustada por edad: 24.3 (IC 95%: 19.3-26.4).

	15-24	25-34	35-44	45-54	55-64	65-74	75-84	>85	total
M	2	1	1						4
F									

F: femenino, M: masculino

Se observaron más suicidios que los esperados ajustados por edad por 100.000, con un índice epidémico=3, aunque las diferencias entre suicidios observados y esperados fue mayor para los adultos mayores. Hubo más suicidios de hombres que mujeres (hombres=93.3%). La media de edad fue 46.6±28.7. En la figura 1 se muestran las 2 agrupaciones espacio-temporales con asociaciones geográficamente significativas ($p<.05$) encontradas en la región de Arrecifes.

Figura 1. Mapa de la Localidad de Arrecifes con agrupamientos significativos (n=2).



En la figura 1 se muestran los conglomerados espacio-temporales con resultados estadísticamente significativos para las ventanas agrupadas de las semanas 1 y 2 y limites críticos de 0-2 km ($p<.05$ en ambos casos). Específicamente el tiempo y la distancia representan las semanas y los kilómetros que separan el primer caso índice de suicidio de los siguientes (tabla 2).

Tabla 2. Asociaciones espaciotemporales significativas entre evento índice y restantes.

	distancia			
tiempo	2.5 km	5 km	10 km	15 km
1 semana	.003	.067	.128	.349
2 semanas	.035	.018	.038	.218
3 semanas	.041	.416	.319	.270
4 semanas	.028	.073	.323	.173

Se evaluaron las diferencias significativas entre eventos de suicidio agrupados en clusters y aquellos fuera de los mismos, para lo cual se analizaron las características socio-demográficas de todos los casos de suicidio para los que se dispuso de datos (tabla 3).

Tabla 3. Características demográficas de suicidios en agrupamientos espaciotemporales y no agrupados (Arrecifes, Buenos Aires) (periodo 2018-2019).

Datos demográficos	N=15(%)	Suicidios agrupados=9 (%)	Suicidios no agrupados=6 (%)	X^2	P (< 0.5)
Genero (hombres)	14 (93.3)	8 (88.8)	6 (100)	1.76	.54
edad					
15-54	9 (60)	7 (77	2 (33.3)	5.32	01
55>	6 (40)	2 (23)	4 (66.7)		
Estado civil [a]					
soltero	5 (33.3)	4 (44.4)	1 (16.6)	5.39	.01
casado	1 (6.6)	0	1 (16.6)		
separado/viudo	6 (40)	5 (55.5)	1 (16.6)		
Estudios [b]					
primaria	8 (53.3)	7 (77.7)	1 (16.6)	6.84	.01
secundaria	2 (13.3)	1 (11.1)	1 (16.6)		
Laboral [c]					
desempleado	8 (51.1)	8 (88.8)	0	7.34	.00

empleado	3 (12.3)	2 (22.2)	1 (16.6)		
jubilado	1 (6.6)	0	1 (16.6)		
convivientes					
solo/a	4 (26.6)	3 (33.3)	1 (16.6)	1.50	.22
pareja/familia	6 (40)	5 (55.5)	1 (16.6		

[a] 3 datos faltantes, [b] 5 datos faltantes, [c] 5 datos faltantes, [d] familia 5 datos faltantes.

Respecto a las características clínicas (tabla 3), entre los casos de suicidio dentro de las agrupaciones no se identificó ningún caso en el que se hubiera establecido un diagnóstico de salud mental actual, aunque solo 3 refirieron tratamientos previos en centros de adicciones por problemática de consumo.

Tabla 3. Características clínicas de suicidios en agrupamientos espacio temporales y los no agrupados.

	N=15(%)	Suicidios agrupados=9 (%)	Suicidios no agrupados=6 (%)	X^2	P (< 0.5)
Tratamientos previos [a]	[a]2 (13.3)	2 (22.2)	0	3.12	.07
Intento suicidio previo [b]	1 (6.6)	1 (11.1)	0	6.12	0.1
Consumo [c]	3 (20)	3 (33.3)	0	3.2	0.7
Violencia escolar [d]	1 (6.6)	1 (11.1)	0	6.12	.01
Conflicto pareja [e]	4 (26.6)	4 (33.3)	1 (16.6)	4.90	.02
Conflicto familiar [f]	4 (26.6)	3 (33.3)	1 (16.6)	2.28	12
Amistades [g]	6 (40)	5 (55.4)	2 (33.3)	3.81	.44
Experiencias vitales estresantes [h]	9.60	8 (88.8)	1 (16.6)	8.90	.00
Metodo suicidio [i]					
ahorcamiento	9 (100)		4 (66.6)	3.46	0.6
incineracion	0		1 (16.6)		

Arma de fuego	0	1 (16.6)

[a] algunas celdas contienen menos de 5 observaciones.

Los suicidios consumados han seguido un comportamiento habitual en el periodo analizado, con predominio masculino, métodos violentos aunque la tasa es algo superior a la esperada y a la media nacional. Para el análisis espaciotemporal de los suicidios se estimaron, en cada evento, las coordenadas temporales dadas por las fechas en que ocurrieron los eventos, y las coordenadas espaciales que se lograron asignándole a cada caso un par de valores de longitud y latitud (X,Y) que representan las coordenadas del centroide de su área. Los resultados de los análisis muestran que existen 2 conglomerados espaciotemporales y 3 geográficos pero no temporales con proximidad altamente significativa.

DISCUSIÓN

El presente estudio revela la existencia de conglomerados espacio-temporales de casos de suicidio en la región de Arrecifes (Provincia de Buenos Aires). La interacción espacio-temporal tuvo una restricción temporal y geográfica de 4 semanas y 2.5 km. La serie de agrupaciones espacio-temporales de casos de suicidio en el presente estudio se incluye en el concepto de agrupaciones puntuales dado que son conglomerados contiguos cronológicamente y espacialmente de eventos. Este tipo de agrupaciones se explica habitualmente por la presencia de exposiciones de aprendizaje directo de los individuos afectados que pueden compartir espacios de transito e intercambio locales, especialmente en localidades poco extensas y de gran concentración de servicios y franjas de desplazamiento. Cuando se compararon los casos de suicidio dentro y fuera de las agrupaciones espaciotemporales nos encontramos con diferencias significativas entre ambos, aunque no se puede afirmar que las mismas estuvieran relacionadas de manera causal con el desencadenamiento de los eventos. En Argentina, cada año, consuman el suicidio alrededor de 3.000 individuos. La tasa de suicidios ajustada por edad detectada en la región de Arrecifes (24.3/100.000 habitantes, IC 95%= 19.3-26.4) fue mayor que la tasa media de suicidios en Argentina (10,1/100.000 habitantes). Esta tasa elevada de suicidio coincide con altas tasas descritas en regiones de escasa extensión geográfica en otras partes del mundo (McKenzie et al, 2005). Arrecifes es una ciudad cabecera del partido homónimo de una extensión de 1180 km^2 de 2.141,2 km^2, con una densidad de 28 habitantes/km^2 y un índice de desarrollo humano (IDH) de .876 (muy alto). El suicidio es frecuente en áreas urbanizadas alejadas de los grandes centros urbanos dado que sus habitantes tienen factores de riesgo socioculturales como un estilo de vida rutinario y demandante físicamente, y menor tasa de utilización de servicios de salud mental, además de relativo aislamiento geográfico y una disponibilidad limitada de apoyo social o emocional, sumado en ocasiones a la percepción subjetiva de dificultades económicas (Hirsh, 2005). Una posible explicación de esta serie de conglomerados espacio-temporales podría ser el efecto de contagio descripto anteriormente. Este efecto resulta de la exposición directa a un evento conocido de suicidio índice, o bien indirecta como conocimiento por información verbal o virtual (Davidson et al, 1989). La exposición directa ejerce su efecto a través de procesos de aprendizaje y modelado social que incluyen la identificación y la imitación. En general las agrupaciones de casos de suicidio son frecuentes entre jóvenes (Phillips y Carstensen, 1986). Pero también hay descriptos casos de adultos mayores con ventanas temporales que van desde 1 semana hasta 8

semanas (Gould et al, 1990). El contagio es uno de los posibles mecanismos para comprender las agrupaciones de eventos suicidas pero también pueden influir factores concurrentes como eventos vitales estresantes, discusiones familiares y percepción subjetiva de desventajas económicas. En general se considera que los conglomerados puntuales de suicidios comparten al menos 4 elementos incluyendo problemas del estado de ánimo (depresión), eventos vitales negativos, percepción de falta de apoyo social, y dificultades para lograr y mantener vínculos grupales, aunque cuando esto último se logra les resulta muy difícil apartarse del grupo y desarrollan vínculos de relación muy dependientes. En el presente trabajo se comprueban algunas de estas hipótesis, ya que hay resultados estadísticamente significativos para problemas de pareja, eventos vitales adversos y estresantes y grupos de amistades con lazos ambivalentes. No se detectó psicopatología en las victimas de suicidio a partir de las declaraciones de los testigos, a excepción del problema de consumo. Posiblemente el efecto de un trastorno mental severo afectaría los vínculos de tal modo que aislaría relativamente al sujeto afectado, impidiéndole exponerse a los estímulos inductores de suicidio en la modalidad de contagio. Los métodos usados para cometer suicidio dentro y fuera de las agrupaciones de suicidio no fueron significativamente diferentes entre sí, aunque están en concordancia con las preferencias culturales en nuestro medio y en países relacionados histórica y culturalmente (Gutierrez, 1998), y a diferencia de lo encontrado en otros países donde la preferencia es por las armas de fuego o el envenenamiento. En otro sentido los resultados del presente estudio indican que el modelo de permutación espaciotemporal resulta conveniente para estudiar agrupaciones espacio-temporales de casos de suicidio. Por otra parte después de un caso índice de suicidio, las medidas posvencion a implementar incluyen identificación de individuos vulnerables para evitar la propagación de la cadena de imitación o contener a los sujetos que comparten rasgos de riesgo de suicidio con el caso índice y asistencia a los familiares y conocidos de las victimas en su proceso de duelo. Dada la relevancia del mecanismo de asociación espacial, temporal o espaciotemporal de los suicidios, aun siendo una proporción menor del total de suicidios, debería incluirse a agentes de salud mental en el equipo de intervención y prevención de suicidio para detectar y apoyar a aquellos sujetos de la comunidad en riesgo, especialmente aquellos próximos a la victima índice o hasta 2 semanas después del evento índice.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El uso de técnicas espacio-temporales demostró su utilidad en la detección de las agrupaciones de casos de suicidio, si bien los modelos bayesianos a diferencia del modelo de permutación espaciotemporal ofrecen una mejor estrategia de modelado para este tipo de análisis. No obstante las técnicas empleadas tienen un nivel de validez robusta. Por otra parte dado el breve periodo de tiempo analizado es poco probable que la población en riesgo subyacente haya podido cambiar sustancialmente. Otra limitación es que se trabajo sobre un área geográfica limitada por lo cual los resultados no podrían extrapolarse a otras regiones. Del mismo modo el pequeño tamaño de la muestra (n=15) previene de extraer conclusiones generalizables. Finalmente no es posible identificar mediante técnicas de análisis espacio temporal aquellos mecanismos o factores causales de estos fenómenos lo cual sería mejor logrado a partir de una sistemática de estudios en terreno reiterados de las agrupaciones de casos de suicidio.

CONCLUSIONES

Los análisis espacio-temporales permiten para identificar agrupaciones puntuales de casos de suicidio y pueden contribuir a su prevención. Dado el mecanismo de expansión temporal especialmente a lo largo de dos semanas después de un caso de suicidio índice, sería conveniente insistir en la publicación de alertas de salud mental durante las 2 primeras semanas después de un suicidio consumado (suicidio índice) y en un radio de al menos 2,5km del área afectada. Se requieren estudios adicionales para confirmar o refutar estas premisas iniciales.

BIBLIOGRAFÍA

- Davidson L, Rosenberg M, Mercy J, Franklin J, Simmons JT. An epidemiologic study of risk factors in two teenage suicide clusters JAMA 1989, 17:2687-2692.
- Brewer CA. ColorBrewer 2.0. Available at http://colorbrewer2.org.
- Cuzick J, Edwards R. Spatial clustering for inhomogeneous populations. Journal of the Royal Statistics Society 1990; 52: 73-104.
- Daine K, Hawton K, Singaravelu V, Stewart A, Simkin S, Montgomery P. The power of the web: a systematic review of studies of the influence of the internet on self-harm and suicide in young people. PLOS ONE 2013; 8: e77555.
- ESRI. ArcInfo GIS v10. Redlands, CA, USA: Environmental Systems Research Institute, Inc; 2011.
- Exeter DJ, Boyle PJ. Does young adult suicide cluster geographically in Scotland? J Epidemiol Community Health. 2007; 61:731-6.
- Glaz J. Approximations for the tail probabilities and moments of the Scan statistics. Statistics in Medicine 1993; 12: 1845-52.
- Gould M, Wallenstein S, Kleinman M, O'Carroll P, Mercy J. Suicide clusters: An examination of age-specific effects Am J Public Health 1990, 80:211-212.
- Gould MS, Petrie K, Kleinman MH, Wallenstein S. Clustering of attempted suicide: New Zealand national data. Int J Epidemiol. 1994; 23:1185-9.
- Gould MS, Wallenstein S, Kleinman M. Time-space clustering of teenage suicide. Am J Epidemiol. 1990; 131:71-8.
- Grimson R, Kulldorff M, Nagarwala N. Spatial disease clusters: detection and inference. Statistics in Medicine 1995; 14: 799-810.
- Gutierrez Garcia J. Predominance of urban suicides over rural suicides in Spain Actas Luso Esp Neurol Psiquiatr Cienc Afines 1998, 26:111-115.
- Hirsch JK. A review of the literature on rural suicide: Risk and protective factors, incidence, and prevention Crisis 2006, 27:189-199.
- Jacquez G & Jacquez C. Infection Control and Hospital Epidemiology. The analysis of Disease Clusters, Part I: Stat Med 1996, 17(5): 319-27.
- Jenks G. The data concept in statistical mapping. The International Yearbook of Cartography. 1967; 7:186–190.

- Johansson L, Lindqvist P, Eriksson A. Teenage suicide cluster formation and contagion: Implications for primary care. BMC Fam Pract. 2006; 7:32.
- Knox, E. The detection of space-time interactions. Appl. Statist.1964; 13: 25-29.
- Kulldorff M, Athas WF, Feuer EJ, Miller BA, Key CR. Evaluating cluster alarms: a space-time scan statistic and brain cancer in Los Alamos, New Mexico. Am J Public Health 1998; 88:1377–1380.
- Kulldorff M, Nagarwalla N. Spatial disease clusters: detection and inference. Stat Med. 1995; 14:799–810.
- Kulldorff M. SatScan v9.1.1: Software for the spatial and space-time scan statistics. Information Management Services, Inc, Silver Spring, Maryland, USA; 2011.
- Kulldorff MA. Spatial scan statistic. Communications in Statistics: Theory and Methods 1997; 26:1481–1496.
- Larkin GL, Beautrais AL. Geospatial mapping of suicide clusters. Auckland: The National Centre of Mental Health Research, Information and Workforce Development., 2012.
- Lawson A. Approaches to space-time modelling of infectious disease behavior. IMA Journal of Mathematics Applied in Medicine and Biology 2000; 17: 1-13.
- Marshall R. A review of methods for the statistical patterns of disease. J. R. Statist. Soc.1991; 154: 421-41.
- McKenzie N, Landau S, Kapur N, Meehan J, Robinson J, Bickley H. Clustering of suicides among people with mental illness Br J Psychiatry 2005; 187:476-480.
- Naus, J. Approximations for distributions of Scan statistics. Journal of the American Statistical Association 1982; 77(377): 177-183.
- Niedzwiedz C, Haw C, Hawton K, Platt S. The definition and epidemiology of clusters of suicidal behavior: A systematic review. *Suicide Life Threat Behav* 2014; 44*:* 569-581.
- Phillips D, Carstensen L. Clustering of teenage suicides after television news stories about suicide N Engl J Med 1986, 11:685-689.
- Robertson L, Skegg K, Poore M, Williams S, Taylor B. An adolescent suicide cluster and the possible role of electronic communication technology. Crisis: The Journal of Crisis Intervention and Suicide Prevention 2012; 33: 239-45.
- Saman DM, Walsh S, Borowko A, Odoi A. Does place of residence affect risk of suicide? a spatial epidemiologic investigation in Kentucky from 1999 to 2008. BMC Public Health. 2012; 12:108.

ABSTRACT

Introduction.

In Argentina cluster suicide remains under investigaed. Main goal of this study was determine if declared suicides between 21/03/2018 and 19/02/2019 in Arrecifes County fits cluster suicide typology, its number, composition and related variables.

Sample and Procedures.

Suicide death rates between 21/03/2018 and 19/02/2019 in Arrecifes County were obtained from Buenos Aires Health Ministry Systematized Information Direction, and posvention polls with bereaved families were held. Data included age and gender, date and mode of suicide besides other factors that could have impinged on the suicide decisión.

Geolocalization.

Suicide cases were mapped onto Arrecifes County map using Google Earth to fix latitud and longitude coordinates folloqing a circular model using ArcGIS v10 sotware to render cartographical images in urban points. Using a bidimensional statistical model with spatio temporal permutation with SaTscan® software we obtained cilindrial windows and significance test was performed with Monte Carlo simulation, the null hypotesis was rejected with $\alpha = .05$ if $p \leq .05$, using Ripley´s K function. Contingency tables were generated for 4 high risk time and spatial lapses confluence combination. For temporal analysis a discrete probabilistic distribution model was generated. Spatial conglomerates wre projected using ArcGIS v10 software.

Results.

During 21/03/2018 and 19/02/2019, in Arrecifes County (Buenos Aires) a total of 15 suicide cases were registered, outnumbering those expected with epidemiological index=3, more male than female (male=93.3%), age mean 46.6±28.7. No mental health issues were identified between cluster suicide cases but drug misuse in 3 of the deceased. Results show that 2 spatio temporal conglomerates emerge and 3 geographical but no temporal ones with significant proximity in Arrecifes. Spatiotemporal interaction had a temporal and geographical restriction to 4 weeks and 2.5 km. When suicide cases inside and outside spatiotemporal conglomerates were compared significant differences emerged although not causally related with event triggers. Age adjusted suicide rate detected in Arrecifes region (24.3/100.000 inhabitants, IC 95%: 19.3-26.4) was greater tahn average suicide rates in Argentina (10,1/100.000 habitantes). Possible explanation could be contagious effect resulting from direct exposure to a an index suicide event o indirectly as verbal or virtual information knowledgement, and social modelling effects. Cluster suicide conglomerates shared 4 elements including mood states (depression) negative life events, perceived lack of social support social and difficulties for reaching and keeping grupal bonds.

Conclusions.

Spatiotemporal analysisi made possible the identification of cluster suicide conglomerates ($X2=4,13$; $gl=1$; $p<0,05$). Taking into account temporal expansion mecahnisms specially during 2 weeks following an iindex suicide case it seems useful to restrict suicide news release during 2 weeks after a consumated suicide (index suicide cas) iin an area comprising at least 2.5 km away from the affected región.

VALOR PRONÓSTICO DE LOS DESBALANCES GENÓMICOS EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE. SU IMPORTANCIA EN LA ESTRATIFICACIÓN DE RIESGO

Irma Slavutsky, Flavia Stella, Camila Galvano, Andrea Krzywinski, Andrea Rodríguez, Soledad Zabaljáuregui

Instituto de Medicina Experimental. IMEX - CONICET - ANM

INTRODUCCIÓN

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células B maduras caracterizada por una infiltración atípica de células plasmáticas en la médula ósea (MO) y la secreción de una proteína monoclonal, el componente M, en suero y/u orina, asociada a alta heterogeneidad clínica. Se origina a partir de un proceso de transformación de múltiples pasos con acumulación progresiva de eventos genéticos que favorecen la proliferación y expansión del clon maligno (Fonseca et al, 2009; Rajkumar, 2020). El MM se encuentra generalmente precedido por una entidad precursora, la gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), presente en más del 3% de la población general mayor de 50 años y con un riesgo medio de progresión a MM del 1% anual (Kyle et al, 2010; Korde et al, 2011).

A nivel genético, el análisis de las alteraciones ha permitido la definición de subgrupos específicos, y provisto las bases para la identificación de genes involucrados en la iniciación y progresión del MM (González-Calle & Fonseca, 2017). El estudio citogenético convencional permite detectar alteraciones cromosómicas en el 30-40% de los casos, valores que alcanzan el 80% cuando se emplea la técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) (Fonseca et al, 2009). En este contexto, a nivel cromosómico podemos distinguir anomalías primarias específicas, asociadas al desarrollo de la patología, presentes inclusive en estadios asintomáticos, y anomalías secundarias relacionadas a la progresión de la enfermedad (Fonseca et al, 2009; Rajkumar, 2020). Las anomalías primarias permiten dividir a los pacientes en dos grandes grupos: hiperdiploides (42-45% de los casos) con ganancia de cromosomas, considerados de buen pronóstico, y no-hiperdiploides (35-40%), con número modal variable, desde hipodiploide hasta pseudotetraploides, asociados a peor evolución clínica. En cuanto a las anomalías secundarias, las mismas se encuentran en baja frecuencia en las entidades indolentes y están relacionadas con progresión de la enfermedad (Fonseca et al, 2009; Rajkumar, 2020). Entre ellas encontramos la deleción/monosomía del cromosoma 13 (45% de los pacientes), la deleción del brazo corto del cromosoma 17 a nivel de 17p13, lugar donde se ubica el gen *TP53* (*Tumor Protein P53*) (8-10%), las alteraciones del cromosoma 1: ganancia/amplificación del brazo largo involucrando fundamentalmente a la banda 1q21 (45-60%) y pérdida de parte del brazo corto particularmente a nivel de 1p32 (30-40%) (Chng et al, 2011; Stella et al, 2014; Rajkumar, 2016), y más recientemente la desregulación del oncogén *MYC* (*Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*) (8q24) (15%) (Chiecchio et al, 2009; Billecke et al. 2013; Walker

et al, 2014) y las deleciones a nivel de 12p13.31, lugar donde mapea el gen *CD27* (*CD27 Molecule*) (Xie et al, 2008).

Recientemente, Walker et al (2019) han identificado un nuevo subgrupo de pacientes con MM de alto riesgo y enfermedad muy agresiva, con características biológicas y clínicas específicas y muy corta SV libre de progresión y global a pesar de los nuevos tratamientos, denominado MM doble *hit*. Este subgrupo corresponde a aproximadamente el 6% del total de los casos e incluye pacientes con: a) inactivación bialélica de *TP53* (deleción en un alelo y mutación en el otro) y, b) estadio clínico ISS III con amplificación de *CKS1B* (≥4 copias). Más recientemente, se incluyó entre los MM doble *hit* a los pacientes con cariotipo hiperhaploide, una alteración numérica rara, que presenta entre 24 y 34 cromosomas, corresponde al 0,25% de los casos con MM al diagnóstico (Ashby et al, 2019), y afecta mayormente a individuos jóvenes (Peterson et al, 2019). Este subgrupo de pacientes muestra con frecuencia monosomía del cromosoma 17, usualmente asociada a mutación de *TP53* en el alelo restante, llevando a inactivación bialélica de dicho gen, quedando por lo tanto incluido en el grupo de MM doble *hit* de muy alto riesgo (Walker et al, 2019). En el presente trabajo se efectuó la caracterización citogenética y citomolecular de rearreglos genómicos en pacientes con MM con diferente evolución clínica, con particular interés en los rearreglos de los genes *MYC* y *CD27* así como en la presencia de MM doble hit, tendiente a una mejor caracterización biológica y una mayor comprensión de los mecanismos patogénicos de esta patología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron retrospectivamente 58 pacientes: 40 con MM al diagnóstico sin tratamiento previo y 18 con MGUS (Tabla 1). Las muestras fueron remitidas por el Servicio de Hemato-Oncología del Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. Las mismas fueron obtenidas por el médico hematólogo con la conformidad y el consentimiento informado de los pacientes. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina. Se detallan a continuación las técnicas empleadas:

- **Cultivo de MO y bandeo G:** Se efectuó cultivo directo y de 72 hs a 37ºC, en medio F-12 suplementado con 20% de suero fetal bovino. Para el análisis citogenético se empleó la técnica de bandeo G con tripsina al 1%, posterior coloración con Wright y observación al microscopio. Los cariotipos fueron descriptos acorde a lo estipulado en el International System for Human Cytogenetics Nomenclature (ISCN, 2016).
- **Hibridación in situ por fluorescencia (FISH):** Se utilizaron las sondas de secuencia única: TP53 (17p13), IGH (14q32), MYC (8q24), CD27 (12p13) y CKS1B (1q21)/CDKN2C (1p32) (LIVE-Lexel, Argentina), acorde al protocolo establecido por los fabricantes. Se evaluaron al menos 200 núcleos interfásicos para cada sonda empleándose para su análisis un microscopio de fluorescencia Olympus CX51 con filtros apropiados.
- **Extracción de ADN total:** Se trabajó con muestras de MO. Se efectuó de acuerdo al protocolo estándar: lisis celular (RCLB: 50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1% de SDS y 50 mM de NaCl), digestión con Proteinasa K (100µg/ml y SDS 0,5%) y posterior extracción por el método de fenol-cloroformo.

- **Mutaciones de *TP53*:** La reacción de PCR se realizó sobre ADN genómico obtenido de células de MO. Se efectuaron 5 reacciones de PCR usando los primers originales IARC (*International Agency for Research on Cancer)* (http://p53.iarc.fr/ProtocolsAndTools) que amplifican los exones 4 a 10 y los límites intrón-exón, seguido de secuenciación bidireccional. Los resultados fueron comparados con bases de datos públicas: IARC TP53 Mutation Database (http://www-p53.iarc.fr), en tanto que la funcionalidad fue analizada usando Seshat database (http://p53.fr/tp53-database/seshat).
- **Análisis estadístico:** La comparación de los datos de los pacientes se efectu**ó** empleando el test de Mann-Whitney. Para el análisis de las variables clínicas y de laboratorio se us**ó** el test `t´ de Student (para las variables cuantitativas) y la prueba de Chi cuadrado o el Test Exacto de Fisher (para variables categóricas). Para todas las evaluaciones se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p<0,05$. Los resultados fueron analizados empleando el programa GraphPad Prism 5.0

RESULTADOS

Análisis de las alteraciones de *MYC* y *CD27.*

En el presente trabajo se efectuó el análisis citogenético y citomolecular de 40 pacientes con MM y 18 con MGUS, cuyas características clínicas se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Características clínicas de los pacientes estudiados.

Características clínicas	MM	MGUS
Casos, n	40	18
Sexo (F/M)	22/18	10/8
Edad Media, años (rango)	61,7 (36-87)	59,8 (37-80)
Estadio clínico DS (%)		
I	35,3	-
II	17,5	-
III	47,2	-
B_2M (media; rango), mg/ml	3,6 (0,15-10,5)	2,7 (1,7-5,5)
LDH (media; rango), U/l	272 (137-509)	448(367-507)
Albúmina (media; rango), mg/dL	3,7 (2,5-4,7)	4,4 (4-5,1)
Creatinina (media; rango), mg/dL	2,5 (0,4-13,5)	1,0 (0,6-1,8)
Calcio (media; rango), g/dL	9,8 (8,6-16)	9,3 (6,4-10,2)
Proteína M (media; rango), g	4,3 (0,6-14,2)	0,84 (0,3-1,4)
Hemoglobina (media; rango), g/dL	11,5 (7,7-14,6)	12,6 (9- 15,8)

IMO, %	50,4 (12-100)	8,6 (8-9)
Lesiones óseas, %	50,0	0
Falla renal, %	23,1	0

n: Número; F: femenino; M: masculino; DS: Durie & Salmon (1975); B_2M: beta 2 microglobulina; LDH: lactato dehidrogenasa; IMO: infiltración de médula ósea.

En cuanto a la distribución de alteraciones citogenéticas y citomoleculares, observamos que el 35,7% del total de los pacientes con MM mostró alteraciones citogenéticas, 40% de las cuales correspondieron a cariotipos complejos, alcanzando el 84% cuando se empleó la técnica de FISH. Respecto de las anomalías por FISH, el 84% de los casos presentaron deleción de *TP53*, el 72,7% rearreglos de *IGH*, y el 62,5% alteraciones del cromosoma 1. En cuanto a las alteraciones de los genes *MYC* y *CD27*, se detectaron anomalías en el 44% y 43% de los casos, respectivamente. Respecto del gen *MYC*, del total de alteraciones, el 66,7% fueron rearreglos (Figura 1) en tanto que el 33,4% restante ganancias/amplificaciones de dicho gen. No se observaron alteraciones en los pacientes con MGUS.

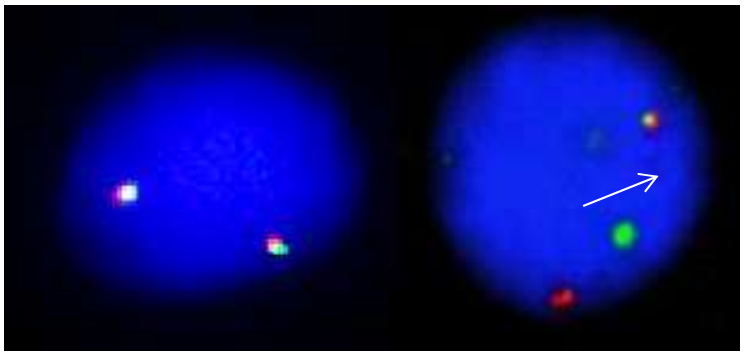


Figura 1: Núcleos interfásicos hibridados con la sonda de MYC (8q24) (LiVE-LEXEL, Buenos Aires, Argentina) mostrando rearreglo de dicho gen (flecha).

Cuando analizamos en particular los casos con alteraciones del gen *MYC*, observamos mayor frecuencia de rearreglos de este gen en los casos con cariotipo normal (77,7%) respecto de aquellos con alteraciones cromosómicas (22,3%). En cuanto a la asociación con alteraciones recurrentes detectadas por FISH, encontramos un alto nivel de asociación con deleción de *TP53* (75% de los casos) y rearreglos de *IGH* (60%), no encontrándose asociación con las características clínicas de los pacientes (Tabla 2).

Por su parte, cuando evaluamos las deleciones de *CD27* (Figura 2), pudimos observar también una alta frecuencia de deleciones de *TP53* (76,9% de los casos) pero un bajo porcentaje de asociación con alteraciones de *MYC* (13,8%).

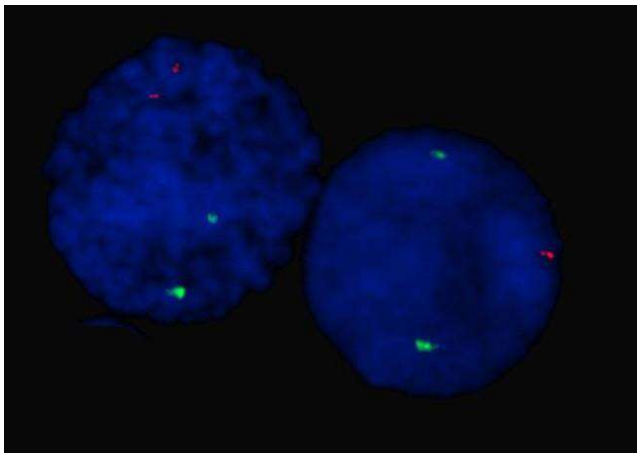


Figura 2: Núcleos interfásicos hibridados con la sonda de CD27 (12p13) (LiVE-LEXEL, Buenos Aires, Argentina) mostrando pérdida de una señal roja (flecha).

Además, al correlacionar la deleción de *CD27* con las características clínicas, encontramos que estos pacientes presentaban una edad al diagnóstico significativamente menor (51,3 años) respecto de aquellos sin deleción (66,1 años) (p=0,03) y tenían un incremento significativo de los niveles de lactato dehidrogenasa (LDH) (361 UI/L) respecto de los casos sin alteración de *CD27* (261,7 UI/L) (p=0,025), parámetro este último de pronóstico adverso en MM (Tabla 2).

Tabla 2: Características clínicas en pacientes con MM con y sin alteración de los genes *MYC* y *CD27*.

	MYC		*CD27*	
Características clínicas	Normal	Rearreglado	Normal	Delecionado
Edad Media, años (rango)	63,0 (36-87)	61,5 (46-76)	51,3 (36-70)	66,1 (44-87)*
B_2M (media; rango), mg/ml	3,8 (0,16-10,5)	2,88 (0,15-2,9)	2,9 (1,8-4,7)	3,7 (0,15-10,5)
LDH (media; rango), U/l	295 (137-429)	287 (140-509)	261,7 (137-429)	361 (307-509)**
Albúmina (media; rango), mg/dL	3,7 (2,5-4,7)	3,8 (3,3-4,7)	3,6 (2,5-4,4)	3,9 (3,7-4,7)
Creatinina (media; rango), mg/dL	2,4 (0,4-13,5)	2,6 (0,6-12,9)	1,4 (0,6-5,6)	4,9 (0,4-13,5)
Calcio (media; rango), g/dL	10,3 (8,6-16)	9,3 (8,7-10,1)	9,2 (8,7-10,1)	9,1 (8,6-10,2)
Proteína M (media; rango), g	3,9 (0,6-16)	5,9 (1,7-14,2)	4,2 (1,2-14,2)	5,3 (0,6-9,4)
Hemoglobina (media; rango), g/dL	11,1 (8,7-14,1)	12,5 (7,7-15,4)	12,3 (8,7-14,1)	11,1 (7,7-15,4)
IMO, %	52,6 (12-100)	45,6 (12-100)	51,9 (12-100)	54,4 (12-100)
Lesiones óseas, %	47,3	57,1	58	50
Falla renal, %	22,0	25,0	15,4	37,5

B_2M: beta 2 microglobulina: LDH: lactato dehidrogenasa; IMO: infiltración de médula ósea; * p=0,03; ** p=0,025.

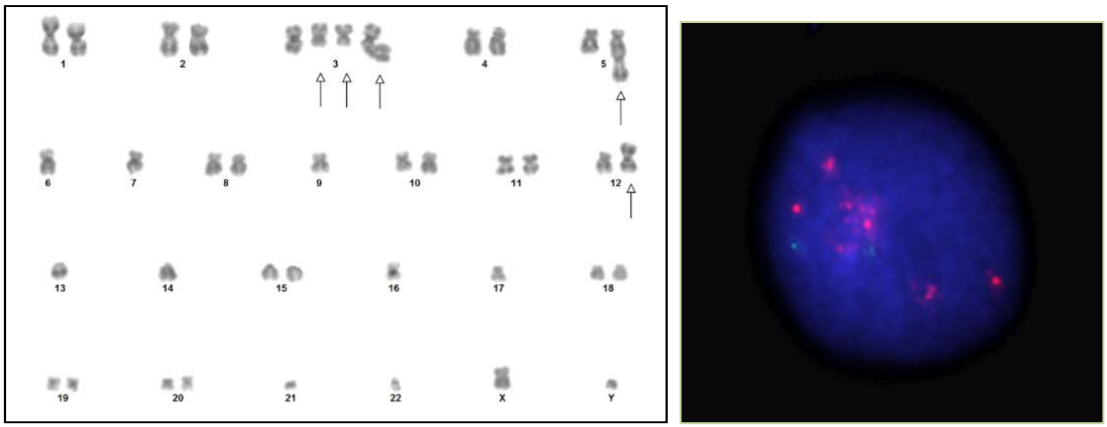
Mieloma múltiple doble hit.

El análisis citogenético, citomolecular y molecular de nuestros pacientes permitió detectar 6 casos con MM doble hit (Tabla 3). Cuatro pacientes presentaron estadio ISS III y amplificación de *CKS1B* (casos 1-4) todos con cariotipo complejo: 3 hiperdiploides y 1 hipodiploide (caso 4; Figura 3a y 3b), y dos con inactivación bialélica de *TP53*: uno con deleción bialélica (caso 5) y el otro con un cariotipo hiperhaploide, con monosomía 17 y mutación de *TP53* en el otro alelo (caso 6), todos ellos con muy mala evolución clínica, resistencia al tratamiento y muy corta sobrevida.

Tabla 3: Características de los pacientes con MM doble hit.

Caso Nº	Edad/ Sexo	Isotipo	Cadena Liviana	Cariotipo	TP53 (%)	CKS1B (%)	IGH (%)
1	73/F	IgG	κ	54~56,XX,+del(1)(p13),+5,+7,+del(8)(p11),+10,+18,+21,+mar[8]/46,XX[17]	9,1	9,8/ 23,4	-
2	70/M	IgG	κ	51~53,Y,psu dic(X;1)(q24;p11),psu dic(1;11)ins inv(1;11)(q10;p13q25)dup (1p?)dup(11q?),+del(3) (p13),+del(6)(q23),der(7)t(7;7)(p22;q32), +9, +der (12)t(X;12)(q13;q13),+13,+15,-16,dup(16) (q12q22),+der(19) t(X;19) (q26;q13), +der(19)t(16;19)(q12;q11),+mar[cp27]	2,6	8,6 *	0,3
3	67/F	IgG	-	54~57,X,-X,+del(1)(p13),+3,+5,+del(6) (q13),+7,i(8)(q10), +9,+9, der(10) t(1;10) (q21;p15),der (11)t(11;13)(p15;q14), der(12)t(1;12) (q21;q24),-13, +15,+15,+der (19)t(19;21) (q13;q11),+20,+21 [cp12]/46,XX[8]	2,7	30,3	8,5**
4	58/M	IgG	κ	42,XY,der(3)t(3;5)(q13;q35),+dic(1;3)(q10;q29),dic(1;5) (p13;q35),-6,-7,der (12) t(12;13) (p11;q14),-14,-22	4	15,3	1
5	53/F	IgG	-	41~43,XX,t(1;5)(q23;p15),?der(3),-7,i(7)(q10),-8,-10,-11,i(11)(q10),-12, del(17)(p13),-22,+mar[cp15]/ clon hipotetraploide complejo [4] /46,XX [6]	50,8#	-	5,8
6	49/F	IgG	κ	31~32,X,+3,+5,+del(6)(q16q23),+7,+11,+15,+18,+19,+der(21)t(17;21) (q11;q10),+22 [cp 14]/46,XX [6]	95,5	-	96

F: femenino; M: masculino; * deleción CDKN2C: 80,4%; **: t(14,16); #: deleción bialélica 16,4%.



a) **b)**

Figura 3: a) Cariotipo complejo del caso 4; b) núcleo interfásico hibridado con la sonda CKS1B(1q21)/CDKN2C(1p32) (Cytocell, UK) mostrando amplificación de *CKS1B* (señal roja).

El análisis molecular de *TP53* mostró la presencia de una mutación sin sentido (transversion T>A), reemplazo de serina por treonina en la posición 241 del codón 721 del exón 7 (c.721T>A) (Figura 4), con efectos deletéreos sobre la funcionalidad de la proteína.

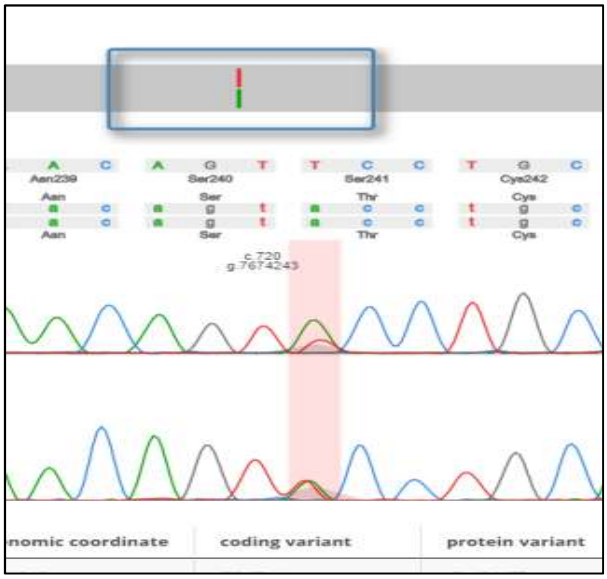


Figura 4: Secuencia del caso 6 mostrando el sitio de la mutación c.721T>A del gen *TP53.*

DISCUSIÓN

Los estudios citogenéticos en MM han demostrado ser una herramienta de relevancia en la caracterización biológica de esta entidad, permitiendo identificar alteraciones asociadas a los diferentes grupos de riesgo. En este trabajo se analizaron alteraciones citogenéticas y citomoleculares en pacientes con MM y MGUS, con particular atención en los rearreglos del gen *MYC* y la presencia de deleciones *CD27*, anomalías poco estudiadas en estas patologías. Los resultados obtenidos fueron correlacionados con las características clínicas de los pacientes.

El análisis citogenético permitió observar anomalías cromosómicas en el 35,7% de los pacientes con MM, valor que se elevó al 84% de los casos cuando se efectuó el análisis citomolecular, resultados que concuerdan con datos previos de la literatura, sustentando la importancia de los estudios genéticos en la clasificación y estimación de riesgo del MM (Klein *et al,* 2011; Boyd *et al,* 2011; Palumbo *et al,* 2015; Rajkumar, 2020).

En cuanto al gen *MYC*, sabemos que en la célula normal participa activamente en diferentes procesos, entre ellos: supervivencia y proliferación celular, replicación del ADN, síntesis proteica, metabolismo energético (Dang, 2012). Nuestro estudio mostró una mayor frecuencia de rearreglos de *MYC* en pacientes con cariotipos normales, asociación poco evaluada en la literatura, y que sustenta la importancia de su análisis en pacientes al diagnóstico. Resulta interesante destacar que además de la translocación, observamos ganancia/amplificación de *MYC*, que evidenciaría en algunos casos rearreglos inter-cromosoma en las translocaciones que involucran a este gen, con alteraciones en el número de copias (Walker *et al*, 2014; Demchenko *et al,* 2016; Mikulasova *et al,* 2020). No observamos asociación con los parámetros clínicos. En concordancia con datos de la literatura, no hallamos rearreglos de *MYC* en nuestros pacientes con MGUS, sustentando que la activación de este gen puede ser un evento importante en la transformación de MGUS a MM. Estos hallazgos confirman reportes previos que observan un aumento de la actividad de *MYC* asociada a la transición de MGUS a MM (Chiecchio et al, 2009; Chng et al, 2011), sustentado la participación de este gen en el desarrollo neoplásico.

Respecto del gen *CD27*, el mismo pertenece a la superfamilia de receptores de necrosis tumoral y como otros miembros de esta familia, activa a la quinasa *JUN* (*Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit*) y a NF-kB (*nuclear factor kappa B*) (Xie et al, 2008). Este gen se expresa en un subgrupo de células B y puede mediar la apoptosis de células hematopoyéticas (Guikema et al, 2003). Nuestros datos muestran una alta frecuencia de deleciones de este gen en pacientes con MM, no observándose esta alteración en MGUS. Asimismo, la correlación con los datos clínicos mostró una menor edad al diagnóstico y aumento de los niveles de LDH, parámetro asociado a masa tumoral. Estudios previos muestran una amplia heterogeneidad en la expresión de *CD27* en pacientes al diagnóstico (Guikema *et al*, 2003), habiéndose detectado una disminución de su expresión que podría relacionarse con una desregulación transcripcional a nivel del ARN mensajero o a la deleción de 12p, asociadas con riesgo de progresión de la enfermedad (Morgan et al, 2006; (Krzeminski *et al,* 2016; Chu et al, 2020). Por su parte, Jiang et al (2012) plantean que *CD27* podría no ser un marcador pronóstico por sí solo sino un indicador de inestabilidad cromosómica en MM, siendo necesarios más estudios para confirmar estos datos.

Por otra parte, detectamos seis pacientes con MM doble hit, un subgrupo de muy mal pronóstico, recientemente identificado (Walker et al, 2019). En concordancia, todos nuestros pacientes mostraron una muy mala evolución clínica, resistencia al tratamiento y muy corta sobrevida. Entre los pacientes observamos un caso con cariotipo hiperhaploide (24-34 cromosomas), un evento muy poco frecuente en MM (Hoctor et al, 2012; Sawyer et al, 2017), pero observado en leucemias agudas y algunos tumores sólidos (Mandahl et al, 2012). En MM, el clon hiperhaploide se caracteriza por presentar monosomía de numerosos cromosomas en tanto que los cromosomas impares, asociados a trisomías en los casos hiperdiploides, permanecen disómicos. Si bien no se conoce exactamente el mecanismo de origen de estos cariotipos, diferentes autores sugieren en base a estudios secuenciales,que el cariotipo hiperhaploide se originaría por la pérdida de cromosomas a partir de un cariotipo diploide, como consecuencia de defectos en el huso

mitótico y/o en los centrosomas que llevarían a una segregación anormal (Walker et al, 2019; Ashby et al, 2019). Reportes recientes (Ashby et al, 2019; Peterson et al, 2019) encontraron una alta frecuencia de inactivación bialélica de *TP53* en pacientes con cariotipos hiperhaploides, permitiendo incluir a estos casos en el subgrupo de MM doble hit, como nuestro paciente que mostró monosomía 17 y mutación de *TP53* en el alelo restante, llevando a la pérdida de función génica. Resulta de interés destacar que la mutación observada (c.721T>A) es de muy baja frecuencia en la literatura, no habiendo sido descripta previamente en MM.

Concluyendo, el presente estudio constituye, a nuestro conocimiento, la primera evaluación del status molecular y citomolecular de *CD27* y *CMYC* en nuestro medio, y confirma el carácter secundario de los rearreglos de *MYC* y la deleción de *CD27*, ausentes en el MGUS, sugiriendo la importancia de incluir el análisis de estos genes en el panel de estudios genéticos de MM al momento del diagnóstico. Asimismo, nuestros datos refuerzan la importancia de los estudios genéticos en la detección de los MM doble hit, grupo de muy alto riesgo, tendiente a lograr una mejor delineación clínico biológica del MM, contribuyendo a definir subgrupos de respuesta al tratamiento en estadios iniciales de la enfermedad, permitiendo una mayor certeza en la evaluación pronóstica así como en la toma de decisiones terapéuticas**.**

REFERENCIAS

- Ashby C, Tytarenko RG, Wang Y, et al. Poor overall survival in hyperhaploid multiple myeloma is defined by double-hit bi-allelic inactivation of *TP53*. Oncotarget 2019; 10: 732-7.
- Billecke L, Penas EM, May AM, et al. Cytogenetics of extramedullary manifestations in multiple myeloma. Br J Haematol 2013; 161: 87-94.
- Boyd KD, Ross FM, Walker BA, et al. Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies *FAM46C* at 1p12 and *CDKN2C* at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. Clin Cancer Res 2011; 17:7776-84.
- Chiecchio L, Protheroe RK, Ibrahim AH, et al. Frequent upregulation of MYC in plasma cell leukemia. Genes, Chrom Cancer 2009; 48:624-36.
- Chng WJ, Huang GF, Chung TH, et al. Clinical and biological implications of *MYC* activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. Leukemia 2011; 25: 1026-35.
- Chu B, Bao L, Wang Y, et al. CD27 antigen negative expression indicates poor prognosis in newly diagnosed multiple myeloma. Clin Immunol 2020; 213:108363.
- Dang CV. MYC on the path to cancer. Cell 2012; 149: 22-35.
- Demchenko Y, Roschke A, Chen WD. Frequent occurrence of large duplications at reciprocal genomic rearrangement breakpoints in multiple myeloma and other tumors. Nucleic Acids Res 2016; 44: 8189-98.
- Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. Cancer 1975; 36: 842-54.

- Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. Leukemia 2009; 23: 2210-21.
- González-Calle V, Fonseca R. Precision Medicine in Myeloma: Challenges in Defining an Actionable Approach Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2017; 17: 621-30.
- Guikema JE, Hovenga S, Vellenga E, et al. *CD27* is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low *CD27* expression in patients with high-risk disease. Br J Haematol 2003; 121: 36-43.
- Hoctor VT, Campbell LJ. Hyperhaploid plasma cell myeloma. Cancer Genet 2012; 205: 414-8.
- ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Lisa G Shaffer, Jean McGowan-Jordan, Michael Schmid (eds), Karger, Basel. 2016.
- Jiang N, Qi C, Yu L, et al. Analysis of chromosome 12p deletion in plasma cell dyscrasias. Leukemia Res 2012; 36: 32-6.
- Klein U, Jauch A, Hielscher T, et al. Chromosomal aberrations +1q21 and del(17p13) predict survival in patients with recurrent multiple myeloma treated with Lenalidomide and Dexamethasone. Cancer 2011; 117: 2136-44.
- Korde N, Kristinsson SY, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. Blood 2011; 117: 5573-81.
- Krzeminski P, Corchete LA, García JL, et al. Integrative analysis of DNA copy number, DNA methylation and gene expression in multiple myeloma reveals alterations related to relapse. Oncotarget 2016; 7: 80664-79.
- Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. Leukemia 2010; 24: 1121-7.
- Mandahl N, Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Disease-associated patterns of disomic chromosomes in hyperhaploid neoplasms. Genes Chrom Cancer 2012; 51: 536- 44.
- Mikulasova A, Ashby C, Tytarenko RG, et al. Microhomology-mediated end joining drives complex rearrangements and over expression of *MYC* and PVT1 in multiple myeloma. Haematologica 2020; 105: 1055-66.
- Morgan TK, Zhao S, Chang KL, et al. Low *CD27* expression in plasma cell dyscrasias correlates with high-risk disease: An immunohistochemical analysis. Am J Clin Pathol 2006; 126: 545-51.
- Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from international myeloma working group. J Clin Oncol 2015; 33: 2863-9.
- Peterson JF, Rowsey RA, Marcou CA, et al. Hyperhaploid plasma cell myeloma characterized by poor outcome and monosomy 17 with frequently co-occurring TP53 mutations. Blood Cancer J 2019; 9: 20.

- Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol 2016; 91: 719-34.
- Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. Am J Hematol 2020; 95: 548-67.
- Stella F, Pedrazzini E, Baialardo E, et al. Quantitative analysis of CKS1B mRNA expression and copy number gain in patients with plasma cell disorders. Blood Cells Mol Dis 2014; 53: 110-7.
- Sawyer JR, Tian E, Shaughnessy JD Jr, et al. Hyperhaploidy is a novel high- risk cytogenetic subgroup in multiple myeloma. Leukemia 2017; 31: 637-44.
- Walker BA, Wardell CP, Brioli A, et al. Translocations at 8q24 juxtapose *MYC* with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. Blood Cancer J 2014; 4: e191.
- Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, et al. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. Leukemia 2019; 33: 159-70.
- Xie P, Kraus ZJ, Stunz LL, et al Roles of TRAF molecules in B lymphocyte function. Cytokine Growth Factor Rev 2008; 19: 199-207.

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a heterogeneous post-germinal center B-cell malignancy. The study of genetic alterations has allowed the definition of specific subgroups, and provided the basis for the identification of genes involved in the initiation and progression of the disease. In this study, we evaluated *MYC* and *CD27* alterations as well as the presence of MM double hit in MM patients. Results were correlated with the prognostic factors of the disease. A total of 58 patients were studied, 40 with MM and 18 with monoclonal gammopathy of uncertain significance (MGUS). G-banded analysis, FISH study and detection of *TP53* mutations were performed. *MYC* and *CD27* alterations were observed in 44% and 43% of cases, respectively. *MYC* rearrangements were associated with abnormal karyotypes (77.7% of cases), *TP53* deletions (75%) and *IGH* rearrangements (60%). No correlation with clinical characteristics were found. CD27 deletions were associated to *TP53* deletions (76.9%), low age at diagnosis (p=0.03) and increased level of lactate dehydrogenase (p=0.025). Patients with MGUS showed normal karyotypes and no FISH alterations, supporting a role in the progression from MGUS to MM. In addition, 6 patients with MM double hit, a new subgroup of cytogenetic high risk, were detected. Four cases showed ISS III and *CKS1B* amplification, all of them with complex karyotypes, and 2 cases had biallelic *TP53* inactivation, 1 with biallelic deletion and the other with monosomy 17 and *TP53* mutation (c.721T>A). All cases showed very bad clinical evolution, resistance to treatment and very short survival. Our results suggest the importance to include the analysis of *MYC* and *CD27* genes in the panel of genetic studies of MM at diagnosis and reinforce the importance of genetic studies in detection of double hit MM, in order to a better clinical-biological delineation of this entity, contributing to a better prognostic evaluation and therapeutic decisions.

PRESENCIA DE VIRUS ONCOGÉNICOS Y POTENCIALMENTE ONCOGÉNICOS EN CAVIDAD ORAL DE PERSONAS VIVIENDO CON VIH

Ailin Angelina Sotelo, Gerardo Deluca

Instituto de Medicina Regional - Universidad Nacional del Nordeste

INTRODUCCIÓN

Los cánceres de cabeza y cuello (CCC) corresponden a procesos oncogénicos originados en células de la mucosa en cavidad oral, faringe, laringe, senos paranasales, cavidad nasal o glándulas salivales. Representan uno de los tipos de cáncer más frecuentes en el mundo, correspondiendo el 90% de éstos a carcinomas escamosos de la mucosa oral (CEMO) (Heroiu Cataloiu, Danciu, & Popescu, 2013) de los cuales una proporción no bien definida están relacionados a agentes virales como factor causal (White, Pagano, & Khalili, 2014). El virus papiloma humano (HPV, human papillomavirus), el Epstein Barr virus (EBV), los virus herpes simplex tipo 1 y 2 (HSV-1, HSV-2), el citomegalovirus humano (CMV) y otros ADN virus como los Polyomavirus (PyV), han sido asociados a diferentes tipos de neoplasias en los últimos 70 años, incluido el cáncer en cavidad oral.

Entre los oncovirus humanos, el HPV es el que tiene una posición destacada como objeto de estudio en cánceres orales, debido particularmente a que los genotipos denominados de alto riesgo (HPV-HR) son la causa principal para el desarrollo de cáncer cervical (CC) (*IARC-OMS Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Volume 90. Human Papilloviruses*, 1995), y éste es un epitelio con similitudes histológicas similares al de cavidad oral. Si bien la epidemiología, la historia natural y la biología molecular de la infección por HPV y el posterior desarrollo de cánceres en el tracto genital ha sido ampliamente estudiado en el pasado, aún restan estudios que permitan elucidar la historia natural de este virus en la cavidad oral. Algunas líneas de investigación sugieren que los CCC HPV positivos tendrían una evolución más favorable que aquéllos HPV negativos (Kim, Leslie; King, Tiffany; Agulnik, 2010) y se ha propuesto que representarían dos subgrupos distintos de tumores con diferente comportamiento biológico, epidemiológico e incluso con diferente pronóstico (Swiecicki, Malloy, & Worden, 2016; Westra & Lewis, 2017). Por esta razón, la detección de HPV podría tener una significativa relevancia clínica. Además, la prevalencia de HPV en cavidad oral de personas sanas se reporta actualmente con una marcada variabilidad entre 0.6% y 81 % (Colon-López et al., 2014; Gillison et al., 2012; Pickard, Xiao, Broutian, He, & Gillison, 2012) lo que se relaciona particularmente al tipo de población considerada y a la región geográfica analizada.

Por otro lado, en individuos con afectación de su sistema inmune, como es el caso de las personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), la probabilidad de infecciones por HPV en la mucosa oral sería mayor respecto a personas HIV negativas (Beachler et al., 2012; Chung, Bagheri, & D'Souza, 2014). Si bien desde hace tiempo se vincula al HPV como uno de los probables causales del cáncer orofaríngeo, su frecuencia en cavidad oral es muy variable alrededor del mundo, posiblemente debido al impacto de otros factores de riesgo conductuales, culturales, sociales y/o económicos que puedan influenciarla. En este contexto, tampoco se debería descartar la probable influencia de otros agentes infecciosos virales que puedan colaborar con la presencia de infección por HPV (Plummer et al., 2016). Argentina no cuenta con un reporte epidemiológico sistematizado de frecuencia de infección de HPV en cavidad oral, el cual sería de suma utilidad, particularmente en regiones donde se registra una alta circulación genital de este virus (Deluca, 2010; Nuevas, Reemergentes, Vision, Gerardo, & Deluca, 2001; Organización Panamericana de la Salud, 2008).

Destacamos el rol protagónico y altamente relevante que ha tenido la epidemiología en la determinación de relación causal de patologías tumorales vinculadas a agentes infecciosos. Un clásico pero contundente ejemplo es el HPV, virus asociado inicialmente al CC a través de estudios epidemiológico-moleculares, para el que varios años después fueron demostrados los mecanismos moleculares implicados en la transformación celular. El estudio de la presencia de infección viral es el primer paso para luego poder profundizar el impacto de estas en los tejidos infectados.

En este contexto, resulta igualmente relevante la identificación de factores socio-económicos, sexuales y de hábitos, característicos de una determinada comunidad o grupo poblacional y que puedan influir en la presencia de infección por estos agentes virales con capacidad oncogénica.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la frecuencia de infección de virus con potencial oncogénico o con probable potencial oncogénico en cavidad oral de personas HIV positivas provenientes de pacientes del Programa de VIH y Hepatitis Virales del Ministerio de Salud de la Provincia de Corrientes, Argentina y analizar la probabilidad de una relación causal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar la presencia de HPV identificando los genotipos virales y su frecuencia relativa.
2. Detectar la presencia y frecuencia de virus de la familia Hespesviridae (HSV-1 y HSV-2, HCMV y EBV) y de la familia Polyomaviridae (MCPyV, BKyV y JCyV).
3. Analizar la significación estadística de las infecciones observadas.
4. Analizar la relación entre la frecuencia de infección de los agentes estudiados y la presencia de ciertos cofactores socio-conductuales propios de los grupos poblacionales estudiados.
5. Elevar a las autoridades sanitarias la información epidemiológica recabada.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Tipo de estudio: Observacional de corte transversal con muestreo no probabilístico por conveniencia.

B. Muestreo: se procedió con estrategias de captación de la población objetivo en la recepción del programa, donde los operadores entregaban un folleto ofreciendo la participación del estudio. Si el participante aceptaba se lo derivaba con la investigadora para su inclusión. Allí se procedía con la toma del material biológico y se completaba la ficha epidemiológica.
Como consideración ética luego de explicar los alcances, limitaciones e implicancias del presente proyecto de investigación y habiendo dejado claro que se trata de una participación voluntaria se procedió a la firma de un consentimiento informado respetando la Declaración de Helsinki en Principios Éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Esta investigación cuenta con la aprobación del Comité de Ética e Investigación del Instituto de Medicina Regional (Código RENIS CE000326), cuyo documento se anexa al presente informe.

C. Tipo de muestra, obtención y conservación: La muestra consistió en enjuagado bucal con 10 ml de solución fisiológica estéril. Para ello, se le proporcionó al voluntario un vaso de colección estéril con 10 ml de solución fisiológica previamente medido, se le pidió que realice un enjuague bucal enérgico durante al menos 30 segundos y que devuelva el total al vaso el contenido al vaso. Las muestras fueron almacenadas en el lugar de muestreo en una conservadora con refrigerantes durante no más de 2 horas corridas hasta la llegada al laboratorio donde fueron conservadas a -20 º C en el mismo vaso estéril donde fueron colectadas. Esta metodología de recolección de material biológico ya ha sido validada por otras investigaciones similares (Fakhry et al., 2006).

D. Ficha Epidemiológica: Cada individuo participante del estudio completo los datos solicitados de forma autónoma excepto que el mismo requirió expresamente la asistencia del investigador para hacerlo.

E. Procesamiento de las muestras:

1. Extracción y purificación de ADN:

   Se procesó de manera conjunta en grupos de diez vasos colectores con muestras, seleccionados al azar. Una vez descongelado el contenido, se lo traslado cuidadosamente en su totalidad a un tubo de polipropileno estéril tipo Falcon de 15 ml debidamente rotulado. Se centrifugó a 1120 G a 4ºC durante 10 min. Luego se descartó el sobrenadante hasta llegar a un volumen final de 3 ml. En el mismo tubo se vortexea para el que pellet constituido por células libres, sarro bucal y otros detritos se mezclen con el sobrenadante remanente y por último se separó el volumen total en dos tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml, uno se almacenó como contramuestra y el otro se procesó para la obtención de ácidos nucleicos mediante el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnosis).

2. Control de extracción de ADN:

   Se utilizaron los cebadores GH20 y PC0433 que amplifica un fragmento del gen de beta-globina humana en un formato de PCR convencional y se reveló en un gel de

agarosa al 2% utilizando GelRed como colorante intercalante. Todas aquellas muestras positivas fueron incluidas en el estudio.

3. Detección y tipificación de ADN de HPV: Este procedimiento se realizó en dos pasos.

   1º Etapa: Tamizaje de las muestras a fin de determinar la presencia de ADN de HPV por PCR convencional utilizando una PCR anidada. El primer round consiste en la amplificación específica de un fragmento de 450 pb del gen conservado L1 con los cebadores PGMY. Al resultado de esta amplificación se lo somete a una nueva PCR con los cebadores GP5+/GP6+ dentro de la misma región, formando un fragmento de 150 pb, en caso de que muestra analizada sea positiva para HPV. Esto permite incrementar la sensibilidad de detección (Fuessel Haws et al., 2004).

   2º Etapa: Las muestras positivas en la primera etapa, fueron genotipadas por Reverse Line Blot, metodología de genotipificación de referencia, en el Servicio de Virus Oncogénicos del INEI-Anlis Instituto Malbrán. Las muestras que no pudieron genotipificarse por esta técnica fueron secuenciadas de manera comercial por química Sanger (Macrogen Inc.).

4. Detección de otros agentes virales:

4.1. *EBV*: Se determinó la presencia genoma viral con la amplificación cualitativa de parte del gen de una proteína de membrana no glicosilada (BFRF1) mediante PCR en tiempo real con sondas de química TaqMan, fluróforo TEXAS RED en un una reacción simple generando un fragmento de 74 bp (Niesters et al., 2000).

4.2. *HSV-1 y HSV-2*: Se determinó la presencia genoma viral con la amplificación cualitativa de parte del gen de la glicoproteína B tipo especifica (gB) mediante PCR en tiempo real con sondas de química TaqMan específicas para cada tipo en una reacción dúplex (en el mismo tubo de reacción). Sonda con fluoróforo FAM para HSV-1 y sonda con flurórofo TEXAS RED para HSV-2 (Namvar, Olofsson, Bergström, & Lindh, 2005).

4.3. *HCMV*: Se determinó la presencia genoma viral con la amplificación cualitativa de parte del gen UL_123 mediante PCR en tiempo real con sondas TaqMan marcadas con fluróforo FAM en una reacción simple generando un fragmento de 88 pb (Kullberg-Lindh, Olofsson, Brune, & Lindh, 2008).

4.4. *JCPyV y BKPyV*: Se determinó la presencia genoma viral con la amplificación cualitativa de parte del gen VP3 (Viral Protein 3) en el caso de BKPyV y mediante la amplificación de un fragmento el late mRNA de JCPyV. Ambas reacciones individuales con sondas de química Taqman con fluoróforo FAM (Watzinger et al., 2004).

4.5. *MCPyV*: Se determinó la presencia genoma viral por la amplificación cualitativa la región codificante para el Large Antigen (LT) (Goh, Lindau, Tiveljung-Lindell, & Allander, 2009) por PCR en tiempo real mediante metodología de colorantes intercalantes.

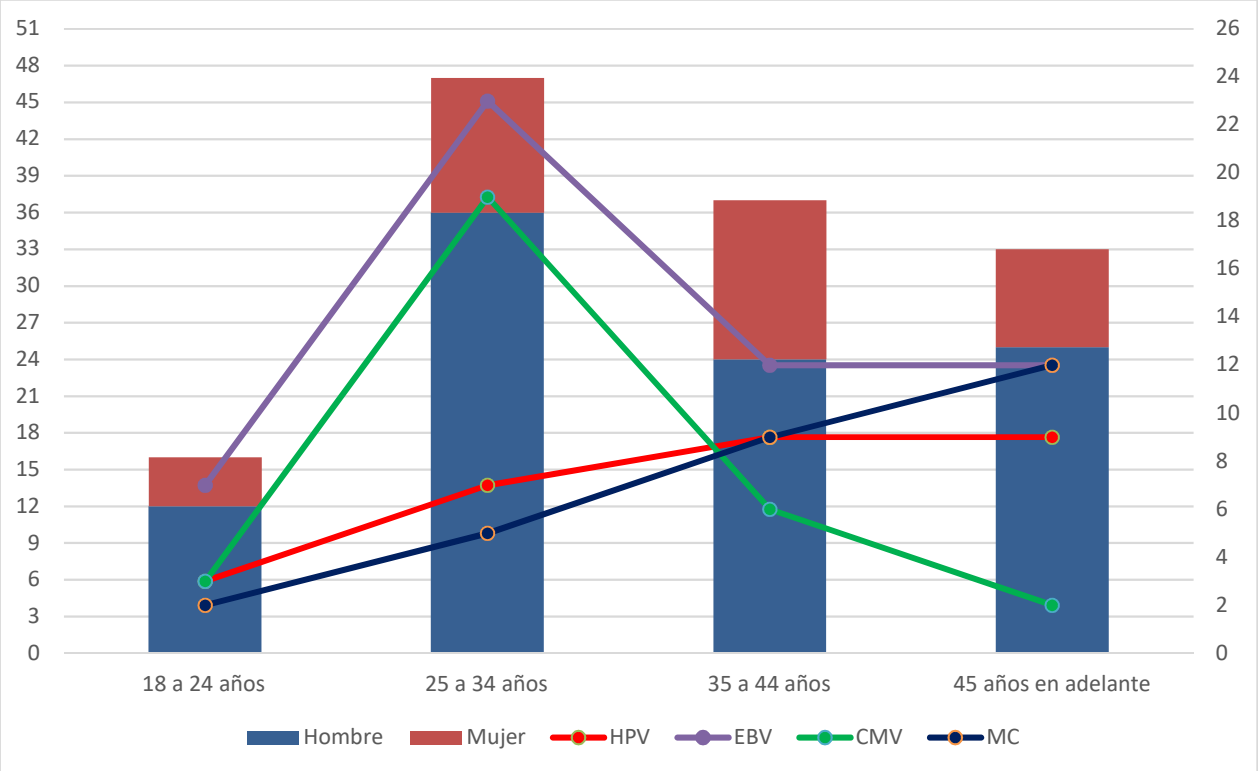
F. Análisis de los resultados: Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa PAWS statistics versión 18(SPSS Inc, n.d.). En todos los casos la prueba estadística considerada fue la de Chi cuadrado, dado que el total de las variables independientes a analizar serán categóricas o se modificaron para que lo sean. Se consideraron como asociaciones estadísticamente significativas entre las variables estudiadas (Edad,

Género, Edad de inicio de relaciones sexuales, Número de parejas sexuales en el último año, Uso de anticonceptivos orales, Uso de preservativos, Práctica de sexo oral, Antecedentes HPV genital; Consumo de Alcohol, Consumo de tabaco, carga viral HIV y porcentaje de CD4+) y la presencia de cada virus, a todas aquellas que arrojaron valores de $p \leq 0.05$. La frecuencia de los virus encontrados se determinó considerando un intervalo de confianza del 95% y se estimó el grado de asociación utilizando el OR (Odds Ratio). Se utilizó regresión logística binaria para ajustar aquellas correlaciones simples bivariantes con $p<0.2$. En el caso de las asociaciones con HPV se en cuenta los casos positivos con cualquier genotipo y en paralelo se aquellos con genotipos de alto riesgo.

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 141 muestras de las cuales 133 fueron aptas para su análisis. Se muestra la composición de la población estudiada y la frecuencia de cada virus estudiado en el Gráfico N°1. La edad media de la población fue de 36.64 (DE. 11.64). del total analizado 95 participantes (71.4%) se autoidentificaron como hombres, 29 (21.8%) como mujeres, 7 participantes como mujer transgénero (5.3%), un participante como hombre transgénero (0.8%) y otro participante como sin género (0.8%).

Gráfico N°1: Población incluida por sexo, rango etario y presencia de los diferentes virus estudiados.



– HPV:

Se obtuvieron 29 casos positivos para HPV lo cual representa una frecuencia de 21.8% (29/133). De los cuales un 41.37% de los casos (12/29) con genotipos de Alto Riesgo (HPV-AR), 20.68% (6/29) con coinfecciones entre genotipos de alto y bajo riesgo y el

restante 37.9% (11/29) con genotipos de bajo riesgo (HPV-BR). Con lo cual totalizan 18 casos (62.05%) con al menos un HPV-AR. De los mismos se detectaron 20 infecciones simples (68.96%) y 9 coinfecciones (31.04). También se destaca que el 72.41% (21/29) de los positivos pertenecen a participantes que se identificaron como hombres, un 17.24% (5/29) como mujeres y el restante 10.34% como mujeres transgénero.

Tres de los casos positivos por tamizaje no se pudieron genotipar por Reverse Line Blot, por lo que fueron enviados a secuenciar, arrojando dos casos de HPV-13 y un caso de HPV-114 que no se encuentran contenidos dentro de las sondas utilizadas para esta metodología.

Los análisis mostraron solo una asociación bivariante. Se extrajeron de dicho análisis con todas las variables socio-conductuales y presencia de otros virus (Ver tabla N°1 en anexo) aquellas asociaciones relevantes ($p<0.2$) para introducir en el modelo multivariante y obtener las asociaciones ajustadas. El modelo multivariante tomando en cuenta el total de los casos positivos para HPV (Tabla N°2) arrojó que hay una prevalencia significativamente más alta entre participantes mayores de 36 años (OR=3.86, IC=1,308-11,395.

En el caso del modelo construido con los casos de HPV-AR (Tabla N°3), el riesgo aumenta significativamente en el caso de personas que se hayan iniciado sexualmente antes de los 15 años (OR=3.36, IC=1,056-10,727).

– EBV:

Se detectaron 55 casos positivos de EBV (41.4%). Luego de obtenerse las asociaciones bivariantes (ver anexo Tabla N°4) se ajustaron las más relevantes (Tabla N°5) dando como resultado que aquellos pacientes con más de 40 copias virales de HIV tienen más riesgo de tener el virus en cavidad oral (OR=2.94, IC=1,210-7,142).

Tabla N°2: Análisis multivariante de los determinantes para infección HPV.

HPV (todos los genotipos)			p	OR ajustado	IC
Rango etario	Menor o igual a 35 años	Ref.	**0,014**	**3,86**	**1,308-11,395**
	Mayor de 36 años				
Orientación Sexual	Heterosexual	Ref.	0,141	2,055	0.788-5,358
	Otras orientaciones				
Uso de anticonceptivos	NO	Ref.	0,511	1,518	0,437-5,274
	SI				
Tabaco	NO	Ref.	0,088	2,299	0,883-5,986
	SI				
Carga Viral HIV	Menos de 40 copias	Ref.	0,352	1,622	0,586-4,491
	Más de 40 copias				
CMV	No detectable	Ref.	**0,043**	**3,233**	**1,036-10,108**
	Detectable				

Tabla N°3: Análisis multivariantes de los determinantes para infección por HPV-AR.

HPV-AR			p	OR ajustado	IC
Uso de anticonceptivos	NO	Ref.	0,097	3,011	0,820-11,060
	SI				
Tabaco	NO	Ref.	0,448	1,57	0,489-5,036
	SI				
Edad de Inicio de relaciones sexuales	Menor de 15 años	Ref.	**0,04**	**3,366**	**1,056-10,727**
	Mayor de 15 años				
N° Parejas sexuales en el último año	Menos de 2 parejas	Ref.	0,147	0,186	0,019-1,807
	Más de 2 parejas				
EBV	No detectable	Ref.	0,607	1,372	0,411-4,578
	Detectable				
Carga Viral HIV	Menos de 40 copias	Ref.	0,313	1,94	0,536-7,027
	Más de 40 copias				
CMV	No detectable	Ref.	0,242	2,072	0,611-7,027
	Detectable				

– HCMV:

Se detectaron 31 casos positivos de HCMV (23.3%). Las mismas asociaciones bivariantes (ver anexo Tabla N°4) se mantuvieron significativas luego del modelo multivariante (Tabla N°6) revelando que los participantes con más de 36 años (OR=4.166, IC=1,374-12,630), con más de 40 copias de carga viral (OR=4.727, IC=1,792-12,469).

– MCPyV:

Se evidencia una frecuencia de 21.1% (28/133) en la población analizada. Sólo una asociación fue significativa tanto en el análisis bivariante (ver Tabla N°4 en anexo) como en el multivariante (Tabla N°7), siendo la edad (mayor a 36 años) el único determinante de riesgo para la presencia de infección por este virus.

Tabla N°5: Análisis multivariante de los determinantes para infección por EBV.

EBV			p	OR ajustado	IC
Rango etario	Menor o igual a 35 años	Ref.	0,828	0,913	0,402-2,074
	Mayor de 36 años				
Sexo	Hombre	Ref.	Ref.		
	Mujer		0,359	0,558	0,160-1,941
	Otros		0,65	0,668	0,136-3,468
Orientación Sexual	Heterosexual	Ref.	0,836	0,909	0,368-2,245
	Otras orientaciones				
Sexo oral	SI		0,591	1,345	

	NO	Ref.			0,456-3,965
Alcohol	SI		0,193	1,785	0,746-4,270
	NO	Ref.			
Tabaco	SI		0,457	1,383	0,589-3,249
	NO	Ref.			
Carga Viral HIV	Menos de 40 copias	Ref.	**0,017**	**2,94**	**1,210-7,142**
	Más de 40 copias				
Porcentaje CD4+	Menor de 29%		0,329	1,546	0,645-3,708
	Mayor al 29%	Ref.			

Tabla N°6: Análisis multivariante de los determinantes para infección por HCMV.

CMV			p	OR ajustado	IC
Rango etario	Menor o igual a 35 años	Ref.	**0,012**	**4,166**	**1,374-12,630**
	Mayor de 36 años				
Carga viral HIV	Menos de 40 copias	Ref.	**0,002**	**4,727**	**1,792-12,469**
	Más de 40 copias				
Sexo oral	NO	Ref.	0,763	1,205	0,360-4,035
	SI				
Alcohol	NO	Ref.	0,691	1,235	0,373,491
	SI				
Tabaco	NO	Ref.	0,62	1,291	0,470-3,546
	SI				

– HSV-1, HSV-2, BKPyV y JCPyV:

Se encontraron sólo 5 casos de HSV-1 (3.8%), todos participantes de identidad sexual masculina y mayores de 36 años y 2 casos de JCPyV (1.5%) también en hombres, pero ambos menores de 35 años. De HSV-2 y BKPyV no se registró ningún caso.

– Coinfecciones:

En cuanto a las coinfecciones encontradas podemos destacar a 14 casos positivos para HPV y EBV, 7 casos positivos para HPV, EBV y CMV y un caso con HPV, EBV, CMV y MCPyV.

Tabla N°7: Análisis multivariante de los determinantes para infección por MCPyV.

MCPyV			p	OR crudo	IC
Rango etario	Menor de 36 años	Ref.	**0,006**	**3,676**	**1,441-9,379**
	Mayor de 36 años				
Orientación Sexual	Heterosexual	Ref.	0,255	0,592	0,240-1,452
	Otras orientaciones				
Vacuna HPV	SI	Ref.	0,089	3,165	0,838-11,949
	NO				
Alcohol	SI		0,264	0,6	0,245-1,471
	NO	Ref.			

DISCUSIÓN

Las personas HIV+ poseen una prevalencia de oncovirus superior y también a los cánceres asociados a estos comparando con personas no inmunosuprimidas (Gillison et al., 2012; McLemore et al., 2010; Webster-Cyriaque, Duus, Cooper, & Duncan, 2006), de hecho existe el doble de riesgo de contraer una infección por HPV siendo HIV+ que una persona sin esta infección preexistente (Houlihan et al., 2012; Stina Syrjänen, 2018). Sin embargo, el rol específico del HPV en el desarrollo de los CEMO y también de las lesiones pre-malignas aún es ampliamente debatido, a pesar de la asociación etiológica indiscutible con CCC (S. Syrjänen, 2011; Stina Syrjänen, 2003). En el presente estudio se encontró una prevalencia global del 21.8%, valores similares a los encontrados en otros estudios (Kahn et al., 2016; Martinelli et al., 2016; Riddell et al., 2022). Sin embargo existen reportes de prevalencias de hasta el 50% entre hombres que mantienen relaciones sexuales con otros hombres, sobre todo en combinación con infecciones anogenitales (Beachler et al., 2012; Mooij et al., 2013; Ucciferri et al., 2018).

Si bien la edad como rango etario en el análisis bivariante no mostró significancia, luego del ajuste multivariante mostró un riego aumentado en mayores de 36 años, dato que pudo ser correlacionado en otros estudios, aunque hechos en población no inmunosuprimida (Brouwer, Eisenberg, Carey, & Meza, 2019). Este fenómeno podría relacionarse con inhabilidad de un rápido clearence en pacientes HIV+ (Grabowska, 2013; Palefsky, 2009; Riddell et al., 2022) o que se sabe que existe un riesgo aumentado de infección asociado con un tratamiento antiretroviral (ART) de muchos años (Méndez-Martínez et al., 2020).

A pesar de que la variable uso de tabaco luego del ajuste multivariante perdiera su significancia, el consumo activo de tabaco ha sido previamente asociado con infecciones orales por HPV en personas HIV+ (Alli et al., 2020; Beachler et al., 2015). Asimismo en variados estudios previos se ha evidenciado una mayor prevalencia de HPV oral en hombres que en mujeres (Brouwer et al., 2019; Kreimer et al., 2004; Sanders, Slade, & Patton, 2012). A pesar de esto, no se evidenció una asociación significativa en el conjunto de datos analizados.

En varios estudios se hace hincapié en que los HSH son el grupo de riesgo más importante para este tipo de infección (Mooij et al., 2013; Ucciferri et al., 2018). En concordancia con esto, la inmensa mayoría de los casos positivos son HSM (hombres que tienen sexo con hombres).

Es de remarcar que en el presente análisis no se encontró asociación entre práctica de sexo oral y presencia de HPV, que si bien es considerado la vía de transmisión principal, existen otros estudios que tampoco han revelado relación entre ambas variables (Ablanedo-Terrazas et al., 2018; Vacharotayangul et al., 2015).

En cuanto a la prevalencia de HPV-AR, el ajuste multivariante arrojó que la edad del primer contacto sexual aumenta el riesgo. Si bien en muchos estudios previos no ha podido correlacionarse infecciones concomitantes orales y genitales en el mismo individuo (Kedarisetty et al., 2016; Patel, Rositch, Gravitt, & Tobian, 2017) si se evidencian relaciones en cuanto al momento de la vida en el cual se produce el primer contacto sexual, pudiendo sugerirse a este, como la primer puerta de entrada (Brouwer et al., 2019; D'Souza et al., 2016).

A pesar de que algunos estudios reflejan que el HPV-16, seguido del HPV-18 son los más prevalentes, tanto en muestras poblacionales (Chung, Bagheri, & Souza, 2013), y específicamente en casos de CEMO (Kreimer, Clifford, Boyle, & Franceschi, 2005), en el presente estudio se han encontrado una amplia variedad de genotipos probablemente reflejando características poblacionales propias. También debe ser tenido en cuenta las diferencias en cuanto a metodología de detección y especialmente el posible efecto que tiene la vacunación contra estos genotipos a pesar de que no hay evidencia de que respalde protección a nivel de cabeza y cuello. A la fecha, sólo se ha demostrado una presencia aumentada de anticuerpos específicos en la saliva (Pinto et al., 2016).

Vale la pena hacer mención además de los genotipos encontrados por fuera del alcance de la metodología de referencia (Reverse Line Blot). El HPV-13 es un genotipo asociado a la enfermedad de Heck o hiperplasia oral multifocal, fuertemente asociado a inmunosupresión y a condiciones socioeconómicas desfavorables y poblaciones indígenas (González-Losa, Suarez-Allén, Canul-Canche, Conde-Ferráez, & Eljure-Lopez, 2011). Es importante destacar que, si bien no podemos hacer la confirmación clínica ya que el muestreo fue a ciegas, hasta ahora es el primer caso encontrado en el noreste argentino, siendo anteriormente reportado en Jujuy (Para, Cosigli, Maldonado, & Chappuis, 1998). Además el HPV-114 es un genotipo muy poco frecuente descripto por primera vez en lesiones cervicales (Ekström, Forslund, & Dillner, 2010). También ha sido reportado en cavidad oral en otra población HIV+ en el norte de Italia (Martinelli et al., 2016), siendo este el primer reporte en Argentina de su presencia en cavidad oral.

El potencial oncogénico de EBV en linfocitos B se encuentra ampliamente estudiado. En relación su rol en tejidos epiteliales, se lo ha asociado a carcinomas nasofaríngeos y gástricos, aunque los mecanismos moleculares subyacentes aún están poco claros (Young, Yap, & Murray, 2016). Aun así, los cánceres de origen epitelial, representan casi el 80% de todos los casos asociados etiológicamente a EBV (Cohen, Fauci, Varmus, & Nabel, 2011). El mecanismo de contagio sucede por la liberación de partículas infectivas en la cavidad oral, que en inmunocompetentes, no suele conllevar ningún síntoma especifico. Sin embargo, en inmunocomprometidos puede derivan en patologías severas, sabiendo que las reactivaciones líticas puede promover la inestabilidad genómica (Fang et al., 2009). De acuerdo a esto se lo ha sugerido como un potencial cofactor en cánceres asociados a HPV. Al igual que con HPV, EBV tiene una alta prevalencia en comparación con personas HIV negativas (McLemore et al., 2010; Webster-Cyriaque et al., 2006).

Existen estudios con valores muy similares a las encontradas en este estudio (Ammatuna et al., 2001), pero existen otros reportes con prevalencias de hasta el 90% que incluso además han reportado estar significativamente asociadas a la alta carga viral y bajo cantidad de CD4+, datos similares a los encontrados en el presente trabajo (Kahn et al., 2016; Miller et al., 2006).

La mayoría de los tejidos humanos pueden ser infectados por CMV, pudiendo establecer o favorecer el proceso oncogénico mediante mecanismos de oncomodulación (Herbein, 2018). Más allá de eso, ya se ha podido establecer a través de la descripción de las alteraciones necesarias en la biología celular, que una infección por CMV cumple con los requisitos necesarios para ser considerado un oncovirus humano, ya que es capaz de evadir supresores de crecimiento, resistir la muerte celular, activar factores de invasión y metástasis, evadir control inmune y causar inestabilidad del genoma (Hanahan & Weinberg, 2011). Entre los datos significativos obtenidos se encuentra que los participantes con edad mayor a 36 años y con una carga viral significativa tiene más probabilidad de infección por CMV. De esto se puede interpretar la importancia del panorama inmunológico de los participantes influye marcadamente en la presencia de este herpesvirus como es de esperarse.

Diferentes estudios in vitro sumaron evidencia de que los HSV pueden actuar como co-factores en cánceres asociados a HPV. Ya sea facilitando la entrada de HPV a subcapas del epitelio (Slattery et al., 1989; Smith, 2002) o interviniendo en otros procesos moleculares subyacentes como la integración del genoma de HPV(Di Paolo et al., 1998; Hara, Kimoto, Okuno, & Minekawa, 1997) o favoreciendo la evasión de la apoptosis(Turunen, Hukkanen, Nygårdas, Kulmala, & Syrjänen, 2014),ponen a estos virus como posibles participantes de un escenario en donde pueden ser partícipes un proceso de “hit and run” anteriormente descripto. Sumado a esto se ha encontrado que CCC coinfectados por HPV-16 y HSV-1 tienen un pronóstico menos favorable (Rautava, Kuuskoski, Syrjänen, Grenman, & Syrjänen, 2012).

El HSV-1 puede ser detectado en saliva, con o sin lesiones variando ampliamente entre individuos, esperando ser más prevalente en aquellos pacientes inmunocomprometidos (Miller & Danaher, 2008). Se establece que se puede detectar HSV-1 en saliva entre 2-5% de las personas, encontrándose la población analizada dentro de los rangos descriptos pero asociada a principalmente a hombres.

Los PyV comparten similaridades funcionales y estructurales con los HPV. Dentro de los PyV, BKPyV y JCPyV son clasificados como carcinógenos 2B (posiblemente carcinógenos en humanos). en las muestras analizadas, se han detectado pocos casos en los participantes de las diferentes poblaciones analizadas, lo cual no ha permitido realizar ninguna asociación estadística, quedando sólo como interpretación que, en el marco de la metodología de detección utilizada, existe escasa cantidad de virus libre en cavidad oral, teniendo en cuenta que ya se ha comprobado que existe una seroprevalencia alta en la gran mayoría de los adultos, sobre todo en países en desarrollo (Knowles, 2006; Vanchiere, 2009). Diversos estudios indican que BKPyV puede ser encontrado en cavidad oral (Jeffers-Francis, Burger-Calderon, & Webster-Cyriaque, 2015; Jeffers, Madden, & Webster-Cyriaque, 2009), sin embargo, no se han encontrado casos en la serie analizada.

También JCPyV, ha sido detectado en numerosos casos de cáncer, especialmente al cáncer colonorectal (Coelho, Almeida, & Lazo, 2010) y existen datos que lo correlacionan con HPV y cáncer cervical en persona HIV+ (Alosaimi, B.; Hampson, L.; He, X.; Maranga, I.; Oliver, 2013). Se pudieron revelan 2 casos en la población analizada, lo cual no permitió hacer ninguna inferencia epidemiológica al respecto.

El único virus considerado como oncogénico dentro de los PyV, el MCPyV, es el agente etiológico de la mayoría de los canceres de células de Merkell (Feng, Shuda, Chang, & Moore, 2008). Las células de Merkell además de encontrarse en el tejido epitelial externo, también se encuentran en las capas basales de la mucosa oral, principalmente el área masticatoria (Aravindha Babu, Malathi, Janani, & Leena Sankari, 2016), por ende su genoma ha sido detectado en tracto aerodigestivo superior y la cavidad oral (Kantola et al., 2009; Loyo, M.; Guerrero-Preston, R.; Brait, M.; Hoque, M. O.; Chuang, A.; Kim, M. S.; Sharm, R.; Liégeois, N. J.; Koch, W. M.; Califano, J. A; Westra, W. H.; Sidranky, 2010). En este caso, la edad ha sido asociada a la presencia de este virus en la población estudiada, así como en otras poblaciones (Windon et al., 2020).

CONCLUSIONES

Es importante resaltar que la epidemiología, esencial para el control de enfermedades infecciosas, puede ser útil para redireccionar los esfuerzos de investigación hacia aspectos muchos más específicos y así desentrañar el rol de diferentes factores en un proceso tan complejo como lo es el desarrollo de un cáncer.

Para sumar más aún complejidad a este contexto, es fundamental evaluar el tinte regional del comportamiento humano, ya que influye marcadamente en el resultado de la ocurrencia de una enfermedad, más allá de que las tendencias globales direccionan al crecimiento de esta patología, el CCO.

Los resultados aquí mostrados revelan ciertas aristas que permiten re direccionar diferentes hipótesis explicativas al hecho de que el CCO se encuentre en franco incremento en la población masculina, pareciéndose a la antítesis de cáncer cervical en mujeres. Pero, a diferencia de este, aún no existen intervenciones de prevención y control, ni mucho menos planificación de políticas de salud que informen a la población de la situación actual.

De alguno de los datos aquí expuestos indican que no debe descartarse el impacto de los oncovirus ya descriptos, tanto como infecciones simples o conjuntas en un contexto en donde factores externos comportamentales (conductas sexuales, tabaco) pueden estar actuando no solo en la progresión maligna sino también como facilitadores de la adquisición o persistencia de la infección viral.

A la fecha, no existen algoritmos de diagnóstico temprano de HPV en cavidad oral, por lo tanto, es fundamental elaborar políticas de prevención, así como algoritmos clínicos de rutina que permitan construir información sobre la progresión de este tipo de enfermedad. Y así, junto con su ensamblaje a otros estudios epidemiológicos similares para poder un poco más de luz al complejo entramado que nos supone una infección viral por un oncovirus y el desarrollo de CCO.

BIBLIOGRAFÍA

- Ablanedo-Terrazas, Y., Romero-Mora, K., Gómez-Palacio, M., Alvarado-de la Barrera, C., Ruiz-Cruz, M., Hernández-Juan, R., & Reyes-Terán, G. (2018). Prevalence and risk factors for oral human papillomavirus infection in Mexican HIV-infected men. *Salud Publica de México*, *60*(6), 653–657. https://doi.org/10.21149/9834.
- Alli, B. Y., Burk, R. D., Fatahzadeh, M., Kazimiroff, J., Grossberg, R. M., Smith, R. V., … Schlecht, N. F. (2020). HIV modifies the effect of tobacco smoking on oral human papillomavirus infection. *Journal of Infectious Diseases*, *222*(4), 646–654. https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa135.
- Alosaimi, B.; Hampson, L.; He, X.; Maranga, I.; Oliver, A. W.; Hampson. I. (2013). Increased prevalence of JC polyomavirus in cervical carcinomas from women infected with HIV. *Journal of Medical Virology*, *86*, 672–677.
- Ammatuna, P., Campisi, G., Giovannelli, L., Giambelluca, D., Alaimo, C., Mancuso, S., & Margiotta, V. (2001). *Presence of Epstein – Barr virus, cytomegalovirus and human papillomavirus in normal oral mucosa of HIV-infected and renal transplant patients*. 34–40.
- Aravindha Babu, N., Malathi, L., Janani, S., & Leena Sankari, S. (2016). Merkel cells - Pathophysiology - A review. *Biomedical and Pharmacology Journal*, *9*(2), 877–879. https://doi.org/10.13005/bpj/1023.
- Beachler, D. C., Sugar, E. A., Margolick, J. B., Weber, K. M., Strickler, H. D., Wiley, D. J., … D'Souza, G. (2015). Risk factors for acquisition and clearance of oral human papillomavirus infection among HIV-infected and HIV-uninfected adults. *American Journal of Epidemiology*, *181*(1), 40–53. https://doi.org/10.1093/aje/kwu247.
- Beachler, D. C., Weber, K. M., Margolick, J. B., Strickler, H. D., Cranston, R. D., Burk, R. D., … D'Souza, G. (2012). Risk factors for oral HPV infection among a high prevalence population of HIV-positive and at-risk HIV-negative adults. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *21*(1), 122–133. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0734.
- Brouwer, A. F., Eisenberg, M. C., Carey, T. E., & Meza, R. (2019). Multisite HPV infections in the United States (NHANES 2003–2014): An overview and synthesis. *Preventive Medicine*, *123*(September 2018), 288–298. https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2019.03.040.
- Chung, C. H., Bagheri, A., & D'Souza, G. (2014). Epidemiology of oral human papillomavirus infection. *Oral Oncology*, *50*(5), 364–369. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.09.003.
- Chung, C. H., Bagheri, A., & Souza, G. D. (2013). Epidemiology of oral human papillomavirus infection. *ORAL ONCOLOGY*, 6–11. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.09.003.
- Coelho, T. R., Almeida, L., & Lazo, P. A. (2010). *JC Virus in the pathogenesis of colorectal cancer, an etiological agent or another component in a multistep process?* Retrieved from http://www.virologyj.com/content/7/1/42.
- Cohen, J. I., Fauci, A. S., Varmus, H., & Nabel, G. J. (2011). Epstein-Barr virus: An important vaccine target for cancer prevention. *Science Translational Medicine*,

3(107), 3–5. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002878.

- Colon-López, V., Quiñones-Avila, V., Del Toro-Mejías, L. M., Reyes, K., Rivera, M. E., Nieves, K., … Ortiz, A. P. (2014). Oral HPV infection in a clinic-based sample of Hispanic men. *BMC Oral Health*, *14*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-7.
- D'Souza, G., Wentz, A., Kluz, N., Zhang, Y., Sugar, E., Youngfellow, R. M., … Gillison, M. L. (2016). Sex Differences in Risk Factors and Natural History of Oral Human Papillomavirus Infection. *Journal of Infectious Diseases*, *213*(12), 1893–1896. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw063.
- Deluca, G. D. (2010). *Epidemiología molecular y cofactores asociados de la infección por virus papiloma humano (hpv) en la comunidad aborigen pilagá de la provincia de Formosa*. Universidad Nacional de Nordeste.
- Di Paolo, J. A., Woodworth, C. D., Coutlée, F., Zimonic, D. B., Brvant, J., & Kessous, A. (1998). Relationship of stable integration of herpes simplex virus-2 Bg/II N subfragment Xho2 to malignant transformation of human papillomavirus-immortalized cervical keratinocytes. *International Journal of Cancer*, *76*(6), 865–871. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980610)76:6<865::AID-IJC16>3.0.CO;2-1.
- Ekström, J., Forslund, O., & Dillner, J. (2010). Three novel papillomaviruses (HPV109, HPV112 and HPV114) and their presence in cutaneous and mucosal samples. *Virology*, *397*(2), 331–336. https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.027.
- Fakhry, C., D'souza, G., Sugar, E., Weber, K., Goshu, E., Minkoff, H., … Gillison, M. (2006). Relationship between prevalent oral and cervical human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and -negative women. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(12), 4479–4485. https://doi.org/10.1128/JCM.01321-06.
- Fang, C. Y., Lee, C. H., Wu, C. C., Chang, Y. T., Yu, S. L., Chou, S. P., … Chen, J. Y. (2009). Recurrent chemical reactivations of EBV promotes genome instability and enhances tumor progression of nasopharyngeal carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, *124*(9), 2016–2025. https://doi.org/10.1002/ijc.24179.
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., & Moore, P. S. (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*, *319*(5866), 1096–1100. https://doi.org/10.1126/science.1152586.
- Fuessel Haws, A. L., He, Q., Rady, P. L., Zhang, L., Grady, J., Hughes, T. K., … Tyring, S. K. (2004). Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5 +/6 + primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *Journal of Virological Methods*, *122*(1), 87–93. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.007.
- Gillison, M. L., Broutian, T., Pickard, R. K. L., Tong, Z. Y., Xiao, W., Kahle, L., … Chaturvedi, A. K. (2012). Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *307*(7), 693–703. https://doi.org/10.1001/jama.2012.101.
- Goh, S., Lindau, C., Tiveljung-Lindell, A., & Allander, T. (2009). Merkel Cell Polyomavirus in Respiratory Tract Secretions. *Emerging Infectious Diseases*, *15*(3), 489–491. https://doi.org/10.1128/jvi.00028-07.

- González-Losa, M. R., Suarez-Allén, R. E., Canul-Canche, J., Conde-Ferráez, L., & Eljure-Lopez, N. (2011). Multifocal epithelial hyperplasia in a community in the Mayan area of Mexico. *International Journal of Dermatology*, *50*(3), 304–309. https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04718.x.
- Grabowska, A. K. (2013). The Invisible Enemy – How Human Papillomaviruses Avoid Recognition and Clearance by the Host Immune System. *The Open Virology Journal*, *6*(1), 249–256. https://doi.org/10.2174/1874357901206010249.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hara, Y., Kimoto, T., Okuno, Y., & Minekawa, Y. (1997). Effect of herpes simplex virus on the DNA of human papillomavirus 18. *Journal of Medical Virology*, *53*(1), 4–12. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199709)53:1<4::AID-JMV2>3.0.CO;2-4.
- Herbein, G. (2018). The human cytomegalovirus, from oncomodulation to oncogenesis. *Viruses*, *10*(8), 1–16. https://doi.org/10.3390/v10080408.
- Heroiu Cataloiu, A.-D., Danciu, C. E., & Popescu, C. R. (2013). Multiple cancers of the head and neck. *Maedica*, *8*(1), 80–85.
- Houlihan, C. F., Larke, N. L., Watson-Jones, D., Smith-Mccune, K. K., Shiboski, S., Gravitt, P. E., … Hayes, R. (2012). Human papillomavirus infection and increased risk of HIV acquisition. A systematic review and meta-analysis. *Aids*, *26*(17), 2211–2222. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328358d908.
- *IARC-OMS Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Volume 90. Human Papilloviruses*. (1995).
- Jeffers-Francis, L. K., Burger-Calderon, R., & Webster-Cyriaque, J. (2015). Effect of Leflunomide, Cidofovir and Ciprofloxacin on replication of BKPyV in a salivary gland in vitro culture system. *Antiviral Research*, *118*, 46–55. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.02.002.
- Jeffers, L. K., Madden, V., & Webster-Cyriaque, J. (2009). BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: Implications for transmission. *Virology*, *394*(2), 183–193. https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.022.
- Kahn, J. A., Rudy, B. J., Xu, J., Kapogiannis, B., Secord, E., Gillison, M., … Health, C. (2016). Prevalence and risk factors for oral DNA tumor viruses in HIV-infected youth. *Journal of Medical Virology*, *88*(April 2014), 1944–1952. https://doi.org/10.1002/jmv.24555.Prevalence.
- Kantola, K., Sadeghi, M., Lahtinen, A., Koskenvuo, M., Aaltonen, L. M., Möttönen, M., … Hedman, K. (2009). Merkel cell polyomavirus DNA in tumor-free tonsillar tissues and upper respiratory tract samples: Implications for respiratory transmission and latency. *Journal of Clinical Virology*, *45*(4), 292–295. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.04.008.
- Kedarisetty, S., Orosco, R. K., Hecht, A. S., Chang, D. C., Weissbrod, P. A., & Coffey, C. S. (2016). Concordant oral and vaginal human papillomavirus infection in the United States. *JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, *142*(5), 457–465. https://doi.org/10.1001/jamaoto.2016.0064.
- Kim, Leslie; King, Tiffany; Agulnik, M. (2010). Head and Neck Cancer: Changing

Epidemiology and Pucblic Health Implicatios. In *Oncology* (Vol. 24, pp. 915–924). https://doi.org/10.1016/B978-0-323-03470-8.00054-5.

- Knowles, W. A. (2006). Discovery and Epidemiology of the Human Polyomaviruses BK Virus (BKV) and JC Virus (JCV). In *Polyomaviruses and Human Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 19–27). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/0-387-32957-9_2.
- Kreimer, A. R., Alberg, A. J., Daniel, R., Gravitt, P. E., Viscidi, R., Garrett, E. S., … Gillison, M. L. (2004). Oral Human Papillomavirus Infection in Adults Is Associated with Sexual Behavior and HIV Serostatus. *The Journal of Infectious Diseases*, *189*(4), 686–698. https://doi.org/10.1086/381504.
- Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., & Franceschi, S. (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systemic review. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *14*(2), 467–475. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0551.
- Kullberg-Lindh, C., Olofsson, S., Brune, M., & Lindh, M. (2008). Comparison of serum and whole blood levels of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA. *Transplant Infectious Disease*, *10*(5), 308–315. https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2008.00313.x.
- Loyo, M.; Guerrero-Preston, R.; Brait, M.; Hoque, M. O.; Chuang, A.; Kim, M. S.; Sharm, R.; Liégeois, N. J.; Koch, W. M.; Califano, J. A; Westra, W. H.; Sidranky, D. (2010). Quantitative detection of Merkell cell virus in human tissues and possible mode of transmission. *Int J Cancer*, *126*(12), 2991–2996.
- Martinelli, M., Mazza, F., Frati, E. R., Fasolo, M. M., Colzani, D., Bianchi, S., … Tanzi, E. (2016). HPV genotypes detected in the oropharyngeal mucosa of HIV-infected men who have sex with men in Northern Italy. *Epidemiology and Infection*, *144*(12), 2641–2647. https://doi.org/10.1017/S0950268816001163.
- McLemore, M. S., Haigentz, M., Smith, R. V., Nuovo, G. J., Alos, L., Cardesa, A., & Brandwein-Gensler, M. (2010). Head and neck squamous cell carcinomas in HIV-positive patients: A preliminary investigation of viral associations. *Head and Neck Pathology*, *4*(2), 97–105. https://doi.org/10.1007/s12105-010-0171-9.
- Méndez-Martínez, R., Maldonado-Frías, S., Vázquez-Vega, S., Caro-Vega, Y., Rendón-Maldonado, J. G., Guido-Jiménez, M., … García-Carrancá, A. (2020). High prevalent human papillomavirus infections of the oral cavity of asymptomatic HIV-positive men. *BMC Infectious Diseases*, *20*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s12879-019-4677-9.
- Miller, C. S., Berger, J. R., Mootoor, Y., Avdiushko, S. A., Zhu, H., & Kryscio, R. J. (2006). High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(7), 2409–2415. https://doi.org/10.1128/JCM.00256-06.
- Miller, C. S., & Danaher, R. J. (2008). Asymptomatic shedding of herpes simplex virus (HSV) in the. *Oral Medicine*, *105*(1), 43–50. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.06.011.
- Mooij, S. H., Boot, H. J., Speksnijder, A. G. C. L., Stolte, I. G., Meijer, C. J. L. M., Snijders, P. J. F., … Schim Van Der Loeff, M. F. (2013). Oral human papillomavirus

infection in HIV-negative and HIV-infected MSM. *Aids*, *27*(13), 2117–2128. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328362395c.

- Namvar, L., Olofsson, S., Bergström, T., & Lindh, M. (2005). Detection and typing of herpes simplex virus (HSV) in mucocutaneous samples by TaqMan PCR targeting a gB segment homologous for HSV types 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(5), 2058–2064. https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2058-2064.2005.
- Niesters, H. G., van Esser, J., Fries, E., Wolthers, K. C., Cornelissen, J., & Osterhaus, a D. (2000). Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(2), 712–715.
- Nuevas, E., Reemergentes, E. Y., Vision, U. N. A., Gerardo, B., & Deluca, D. (2001). *Actualizaciones enfermedades nuevas, emergentes y reemergentes. una vision global*. *1*, 1–10.
- Organización Panamericana de la Salud. (2008). Organización Mundial de la Salud. In *Proyecto para el mejoramiento del Programa Nacional de Prevención de Cáncer de Cuello Uterino en Argentina. Informe final: Diagnóstico de situación del Programa Nacional Y Programas Provinciales*. Retrieved from https://www.who.int/es%0Ahttp://www.who.int/es/.
- Palefsky, J. (2009). Human papillomavirus-related disease in people with HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS*, *4*(1), 52–56. https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32831a7246.
- Para, M. B., Cosigli, J. E., Maldonado, S. M., & Chappuis, J. M. (1998). Hiperplasia epitelial focal. *Rev Argent de Dermatol*, *79*(3), 155–157. https://doi.org/10.9771/cmbio.v21i1.46396.
- Patel, E. U., Rositch, A. F., Gravitt, P. E., & Tobian, A. A. R. (2017). Concordance of Penile and Oral Human Papillomavirus Infections Among Men in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*, *215*(8), 1207–1211. https://doi.org/10.1093/infdis/jix116.
- Pickard, R. K. L., Xiao, W., Broutian, T. R., He, X., & Gillison, M. L. (2012). The Prevalence and Incidence of Oral Human Papillomavirus Infection Among Young Men and Women, Aged 18–30 Years. *Sexually Transmitted Diseases*, *39*(7), 1. https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e31824f1c65.
- Pinto, L. A., Kemp, T. J., Torres, B. N., Isaacs-Soriano, K., Ingles, D., Abrahamsen, M., … Giuliano, A. R. (2016). Quadrivalent Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Induces HPV-Specific Antibodies in the Oral Cavity: Results from the Mid-Adult Male Vaccine Trial. *Journal of Infectious Diseases*, *214*(8), 1276–1283. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw359.
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, *4*(9), e609–e616. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7.
- Rautava, J., Kuuskoski, J., Syrjänen, K., Grenman, R., & Syrjänen, S. (2012). HPV genotypes and their prognostic significance in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Clinical Virology*, *53*(2), 116–120. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.11.005.

- Riddell, J., Brouwer, A. F., Walline, H. M., Campredon, L. P., Meza, R., Eisenberg, M. C., … Schlecht, N. F. (2022). Oral human papillomavirus prevalence, persistence, and risk-factors in HIV-positive and HIV-negative adults. *Tumour Virus Research*, *13*(April), 200–237. https://doi.org/10.1016/j.tvr.2022.200237.
- Sanders, A. E., Slade, G. D., & Patton, L. L. (2012). National prevalence of oral HPV infection and related risk factors in the U.S. adult population. *Oral Diseases*, *18*(5), 430–441. https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01892.x.
- Slattery, M. L., Overall, J. C., Abbott, T. M., French, T. K., Robison, L. M., & Gardner, J. (1989). Cervical Cancer : Support for a Sexually Transmitted. *American Journal of Epidemiology*, *130*(2), 248–258.
- Smith, J. S. (2002). Herpes Simplex Virus-2 as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer. *Cancer Spectrum Knowledge Environment*, *94*(21), 1604–1613. https://doi.org/10.1093/jnci/94.21.1604.
- SPSS Inc. (n.d.). *PASW Statistics for Windows, Version 18.0* (p. Chicago: SPSS Inc.). p. Chicago: SPSS Inc..
- Swiecicki, P. L., Malloy, K. M., & Worden, F. P. (2016). Advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma: Pathogenesis, treatment, and novel therapeutic approaches. *World Journal of Clinical Oncology*, *7*(1), 15–26. https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.15.
- Syrjänen, S. (2011). Human papillomavirus infection and its association with HIV. *Advances in Dental Research*, *23*(1), 84–89. https://doi.org/10.1177/0022034511399914.
- Syrjänen, Stina. (2003). Human papillomavirus infections and oral tumors. *Medical Microbiology and Immunology*, *192*(3), 123–128. https://doi.org/10.1007/s00430-002-0173-7.
- Syrjänen, Stina. (2018). Oral manifestations of human papillomavirus infections. *European Journal of Oral Sciences*, *126*, 49–66. https://doi.org/10.1111/eos.12538.
- Turunen, A., Hukkanen, V., Nygårdas, M., Kulmala, J., & Syrjänen, S. (2014). The combined effects of irradiation and herpes simplex virus type 1 infection on an immortal gingival cell line. *Virology Journal*, *11*(1). https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-125.
- Ucciferri, C., Tamburro, M., Falasca, K., Sammarco, M. L., Ripabelli, G., & Vecchiet, J. (2018). Prevalence of anal, oral, penile and urethral human papillomavirus in HIV infected and HIV uninfected men who have sex with men. *Journal of Medical Virology*, *90*(2), 358–366. https://doi.org/10.1002/jmv.24943.
- Vacharotayangul, P., Rungsiyanont, S., Lam-ubol, A., Pankam, T., Rodbamrung, P., Naorungroj, S., & Phanuphak, N. (2015). Higher prevalence of oral human papillomavirus infection in HIV-positive than HIV-negative Thai men and women. *Cancer Epidemiology*, *39*(6), 917–922. https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.10.010.
- Vanchiere, J. A. (2009). Human polyomaviruses. In R. D. Feigin (Ed.), *Feigin & Cherry's textbook of pediatric infectious diseases* (6th. Editi). Philadelphia: Sauders/Elservier.
- Watzinger, F., Suda, M., Preuner, S., Baumgartinger, R., Baskova, L., Niesters, H. G. M., … Lion, T. (2004). Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and

Monitoring of Pathogenic Human Viruses in Immunosuppressed Pediatric Patients Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and Monitoring of Pathogenic Human Viruses in Immunosuppressed Pediatric Pati. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(11), 5189–5198. https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5189.

- Webster-Cyriaque, J., Duus, K., Cooper, C., & Duncan, M. (2006). Oral EBV an KSHV Infection in HIV. *Adv Dent Res*, (19), 91–95.
- Westra, W. H., & Lewis, J. S. (2017). Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. *Head and Neck Pathology*, *11*(1), 41–47. https://doi.org/10.1007/s12105-017-0793-2.
- White, M. K., Pagano, J. S., & Khalili, K. (2014). Viruses and human cancers: A long road of discovery of molecular paradigms. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(3), 463–481. https://doi.org/10.1128/CMR.00124-13.
- Windon, M., Fakhry, C., Rooper, L., Ha, P., Schoppy, D., Miles, B., … D'Souza, G. (2020). The Role of Age and Merkel Cell Polyomavirus in Oral Cavity Cancers. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*, *163*(6), 1194–1197. https://doi.org/10.1177/0194599820932553.
- Young, L. S., Yap, L. F., & Murray, P. G. (2016). Epstein-Barr virus: more than 50 years olg and still providing surprises. *Nature Reviews Cancer*, *16*, 769–802. https://doi.org/10.1038/nrc.2016.92.

ABSTRACT

Individuals who are HIV+ have a higher prevalence of oncoviruses and associated cancers compared to non-immunosuppressed individuals. The risk of contracting HPV infection is twice as high for HIV+ individuals compared to those without this preexisting infection. However, the specific role of HPV in the development of oral and oropharyngeal cancers (CEMO) and pre-malignant lesions is still debated, despite its undeniable etiological association with cervical cancer. A study found an overall HPV prevalence of 21.8%, similar to other research. Age initially showed no significance but became a risk factor for HPV infection in multivariate analysis, particularly in individuals over 36 years, potentially due to immune clearance issues in HIV+ patients or prolonged antiretroviral therapy.

HPV prevalence was higher in men than women, in line with other studies. HPV was most prevalent in men who have sex with men, reinforcing their higher risk. Although oral sex is considered the main transmission route, no significant association was found between oral sex and HPV presence.

For high-risk HPV, the age of first sexual contact increased the risk. This study found a variety of different genotypes, possibly due to population characteristics and vaccination effects. EBV frequency is associated with higher HIV viral load, like in other researches. CMV, known for oncomodulation, is associated with older participants and significant viral loads in this study.

HSV may co-participate in HPV-associated cancers, but data inconsistency exists. HSV-1, detectable in saliva, is more prevalent in immunocompromised patients. BKPyV and JCPyV, classified as possibly carcinogenic, showed low prevalence. MCPyV, an

oncogenic PyV linked to Merkel cell carcinoma showed an important frequency and is associated with older age.

Local epidemiology is crucial for infectious disease control. Various factors—oncoviruses, behavior, tobacco—may contribute to malignancy. Early diagnosis algorithms for oral HPV are lacking, necessitating prevention policies and clinical routines. This study contributes to understanding viral infections' complex impact on cancer development.

ANEXO

Tabla N°1: Análisis bivariante para HPV.

Análisis Bivariante		HPV (todos)					HPV-AR				
		No Detectable	Detectable	p	OR	IC	No Detectable	Detectable	p	OR	IC
Rango etario	Menor de 36 años	58	11	0,08	2,109	0,906-4,911	57	8	0,269	1,742	0,646-4,692
	Mayor de 36 años	45	18				45	11			
Sexo	Hombre	74	21	Ref.			73	13	Ref.		
	Mujer	24	5	0,573	0,734	0,250-2,159	24	5	0,785	1,17	0,378-3,621
	Otros	6	3	0,445	1,762	0,406-7,649	6	1	0,953	0,936	0,104-8,427
Orientación Sexual	Heterosexual	52	9	0,07	2,222	0,926-5,334	52	7	0,274	1,748	0,637-4,764
	Otras orientaciones	52	20				51	12			
Edad de Inicio de relaciones sexuales	Menor de 15 años	26	10	0,309	1,579	0,652-3,826	26	8	0,132	2,154	0,782-5,934
	Mayor de 15 años	78	19				77	11			
N° Parejas sexuales en el último año	Menos de 2 parejas	87	25	0,739	0,819	0,252-2,665	86	18	0,204	0,281	0,035-2,249
	Más de 2 parejas	17	4				17	1			
Uso de anticonceptivos hormonales	SI	11	7	0,059	2,69	0,936-7,729	11	5	0,064	2,987	0,902-9,891
	NO	93	22				92	14			
Uso de preservativos	SIEMPRE	60	19	0,448	0,718	0,304-1,649	60	12	0,69	0,814	0,296-2,237
	A VECES O NUNCA	44	10				43	7			
Sexo oral	SI	73	23	0,333	1,628	0,604-4,389	72	14	0,74	1,206	0,399-3,638
	NO	31	6				31	5			
Vacuna HPV	SI	23	8	0,538	0,745	0,292-1,902	23	5	0,704	0,805	0,262-2,471
	NO	81	21				80	14			
Antecedentes HPV	SI	20	8	0,239	1,6	0,619-4,134	19	5	0,428	1,579	0,507-4,918
	NO	84	21				84	14			
Alcohol	SI	63	17	0,849	0,922	0,399-2,129	62	12	0,808	1,134	0,412-3,119

	NO	41	12				41	7			
Tabaco	SI	28	14	**0,029**	**2,533**	**1,083-5,912**	28	8	0,19	1,948	0,710-5,343
	NO	76	15				75	11			
Carga Viral HIV	Menos de 40 copias	66	14	0,14	0,537	0,234-1,233	66	8	0,072	2,453	0,906-6,639
	Más de 40 copias	38	15				37	11			
Porcentaje CD4+	Menor de 29%	39	10	0,553	0,769	0,323-1,831	39	6	0,441	0,663	0,232-1,894
	Mayor al 29%	57	19				56	13			
CMV	No detectable	84	20	**0,035**	**2,567**	**1,049-6,279**	52	7	**0,009**	**4,727**	**1,377-16,224**
	Detectable	18	11				11	7			
EBV	No detectable	64	41	0,296	1,561	0,675-3,609	63	8	0,134	2,113	0,783-5,697
	Detectable	14	14				41	11			
MCPyV	No detectable	85	20	0,272	1,7	0,655-4,412	84	14	0,48	1,5	0,484-4,651
	Detectable	20	8				20	4			

*Análisis con todos los casos positivos para HPV, **Análisis teniendo en cuenta solo positivos con genotipos de alto riesgo.

Tabla N°4. Análisis bivariante para EBV, CMV y MCPyV.

Análisis Bivariante		EBV					CMV					MCPyV				
		No detectable	Detectable	p	OR	IC	No detectable	Detectable	p	OR	IC	No detectable	Detectable	p	OR	IC
Rango etario	Menor de 36 años	36	33	0,091	0,545	0,269-1,104	46	23	**0,002**	**4**	**1,576-10,154**	61	8	**0,01**	**3,547**	**1,430-8,794**
	Mayor de 36 años	42	21				56	7				43	20			
Sexo	Hombre	21	44	Ref.			73	22	Ref.			76	19	Ref.		
	Mujer	51	8	0,074	0,442	0,178-1,096	21	8	0,626	1,264	0,492-3,248	22	7	0,632	1,273	0,474-3,418
	Otros	6	3	0,454	0,58	0,137-2,454	8	1	0,405	0,415	0,049-3,5	7	2	0,874	1,143	0,220-5,959
Orientación Sexual	Heterosexual	40	21	0,135	1,702	0,844-3,439	49	12	0,361	1,464	0,644-3,325	44	17	0,076	0,467	0,199-1,904
	Otras orientaciones	38	34				53	19				61	11			
	Menor de 15 años	22	14	0,725	1,151	0,526-2,514	27	9	0,779	0,88	0,361-2,146	27	9	0,496	0,731	0,295-1,808

Edad de Inicio de relaciones sexuales	Mayor de 15 años	56	41				75	22				78	19			
N° Parejas sexuales en el último año	Menos de 2 parejas	65	47	0,741	0,851	0,327-2,217	86	26	0,953	1,034	0,346-3,092	89	23	0,736	1,209	0,401-3,647
	Más de 2 parejas	13	8				16	5				16	5			
Uso de anticonceptivos	SI	9	9	0,423	0,667	0,246-1,806	13	5	0,63	0,76	0,248-2,328	14	4	0,934	0,896	0,278-3,061
	NO	69	46				89	26				91	24			
Uso de preservativos	SIEMPRE	49	30	0,339	1,408	0,698-2,841	62	17	0,555	1,276	0,567-2,873	65	14	0,254	1,625	0,702-3,370
	A VECES O NUNCA	29	25				40	14				40	14			
Sexo oral	SI	52	44	0,091	0,5	0,222-1,125	71	25	0,23	0,55	0,205-1,473	78	18	0,294	1,605	0,660-3,902
	NO	26	11				31	6				27	10			
Vacuna HPV	SI	18	13	0,94	0,969	0,429-2,190	22	9	0,389	0,672	0,271-1,666	28	3	0,076	3,03	0,848-10,826
	NO	60	42				80	22				77	25			
Antecedentes HPV	SI	15	13	0,539	0,769	0,332-1,780	21	7	0,812	0,889	0,337-2,343	24	4	0,323	1,778	0,562-5,628
	NO	63	42				81	24				81	24			
Alcohol	SI	42	38	0,077	0,52	0,253-1,077	58	22	0,16	0,539	0,226-1,286	67	13	0,095	2,034	0,876-4,725
	NO	36	17				44	9				38	15			
Tabaco	SI	20	22	0,079	0,517	0,246-1,085	29	13	0,157	0,55	0,239-1,265	34	8	0,7	1,197	0,479-2,993
	NO	58	33				73	18				71	20			
Carga viral HIV	Menos de 40 copias	56	24	**0,001**	**3,288**	**1,591-6,796**	72	8	**0**	**6,9**	**2,7-17,147**	61	19	0,329	0,657	0,272-1,588
	Más de 40 copias	22	31				30	23				44	9			
Porcentaje CD4+	Menor de 29%	34	15	**0,032**	**2,267**	**1,064-4,827**	40	9	0,304	0,63	0,260-1,527	38	11	0,853	1,086	0,455-2,57
	Mayor al 29%	38	38				56	20				60	16			

ANÁLISIS DE MUTACIONES DEL GEN *TP53* EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA. SU IMPORTANCIA CLÍNICA

Carmen Stanganelli [1], Juana Cabrera [1], Marcela Sarmiento [2]

[1] División Patología Molecular y [2] Servicio de Clínica Hematológica,
Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la forma más común de leucemia en adultos en el mundo occidental, representando alrededor del 30% de todas las leucemias (1). Presenta un curso clínico muy variable asociado a la diversidad de alteraciones genéticas identificadas en esta patología (2). Esto determina la necesidad de disponer de marcadores pronóstico y predictivos de sobrevida y respuesta al tratamiento, esenciales para el manejo de la enfermedad. Entre ellos encontramos las mutaciones del gen supresor tumoral *TP53* (*tumor protein P53*) y/o las deleciones de 17p13 (del17p13), lugar donde mapea dicho gen.

Asimismo, el estado mutacional de los genes IGHV (*immunoglobulin heavy chain variable región*) es uno de los más importantes factores pronóstico en LLC, habiendo permitido definir dos grupos con diferente curso clínico: pacientes con el gen mutado (M) (<98% de homología con respecto a la línea germinal, LG), asociados a buena evolución clínica, y aquellos con IGHV no mutado (NM) (≥98%), relacionados a progresión de la enfermedad (3, 4). Diferentes estudios han demostrado la existencia de una fracción de pacientes que presentan BCRs (*B-cell receptors*) de alta homología en la secuencia de aminoácidos de la región VH CDR3 de la cadena pesada de inmunoglobulinas IGHV, denominados estereotipados. En algunos casos, la presencia de BCRs estereotipados se correlaciona con el curso clínico de la enfermedad.

Por su parte, el gen supresor tumoral *TP53* codifica un factor de transcripción que desempeña un papel central en el mantenimiento de la integridad del genoma y en la respuesta al estrés celular, regula la expresión de genes diana que participan en el control del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del ADN y cambios en el metabolismo (5). Dicho gen codifica una proteína de 393 aminoácidos (aa) que comprende 11 exones, de los cuales el exón 1 es no-codificante, en el exón 2 existen dos sitios de inicio de la transcripción y el 11 contiene el codón de terminación y una gran secuencia no codificante. Aunque la mayoría de las mutaciones se agrupan dentro del dominio de unión al ADN (codones 100–300, exones 4-8), se han detectado mutaciones en casi todos los codones, determinando que la secuenciación deba cubrir el dominio de unión al ADN y el dominio de oligomerización (exones 4–10), aunque idealmente debería analizarse la secuencia codificante entera (exones 2-11) (Figura 1).

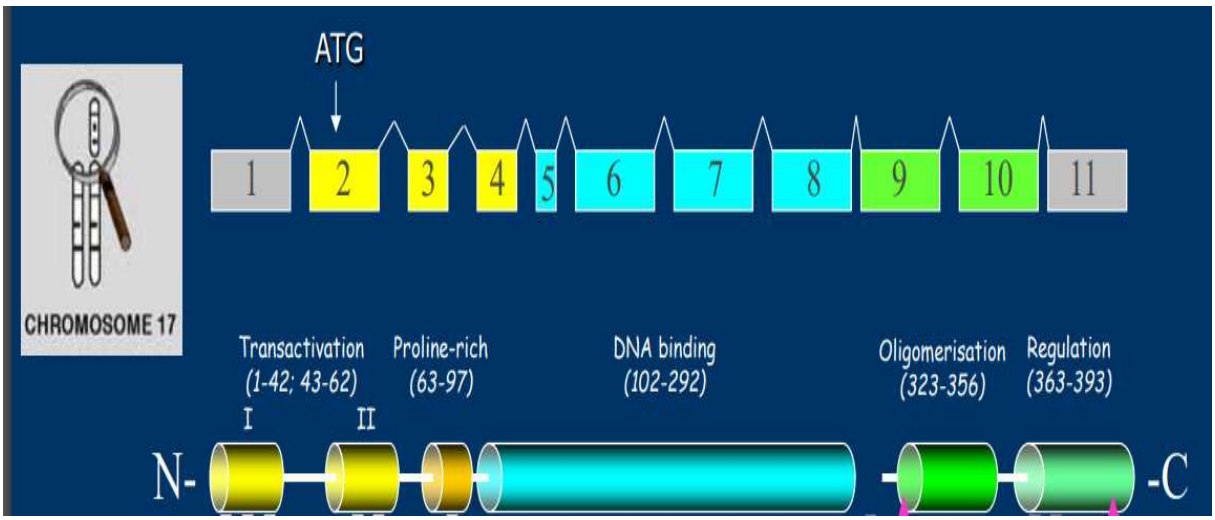


Figura 1: Organización del gen *TP53* y distribución de mutaciones por exones. (Modificado de http://p53.iarc.fr).

Los primeros estudios utilizando la técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) revelaron que los pacientes con LLC que presentan la del17p13 mostraban una sobrevida significativamente menor respecto de los casos que tenían otras anomalías citogenéticas recurrentes (2), así como tiempos cortos para la progresión de la enfermedad y respuestas deficientes al tratamiento inmuno-quimoterápico (6, 7), constituyendo un fuerte marcador pronóstico y predictivo (8, 9).

Al presente, los defectos de este gen, tanto las deleciones como las mutaciones de *TP53,* constituyen biomarcadores claves en la toma de decisiones terapéuticas en LLC (10, 11). Las mutaciones incluyen variantes con cambio de sentido (missense), inserciones o deleciones (indels), mutaciones sin sentido (nonsense) o mutaciones en el sitio de splicing. Aunque las transiciones son frecuentes, son raras en los sitios CpG. Las combinaciones de estos mecanismos determinan la pérdida de la función del gen *TP53* (Figura 2) (12, 13), siendo el más frecuente la del17p13 en un alelo asociada con mutación del alelo restante, presente en hasta 2/3 de los casos. Otros pacientes presentan sólo deleción (10%) o mutación en ausencia de deleción con una frecuencia que varía entre 20-30% en los distintos estudios, dependiendo de la cohorte estudiada y la metodología utilizada. La alta frecuencia de mutación sin deleción es debida a la presencia de mutaciones en ambos alelos, en algunos casos la mutación puede estar acompañada de una pérdida de heterocigosidad del alelo restante, resultando en la duplicación del alelo mutado (9). Estas anomalías (deleción y/o mutaciones) ocurren en aproximadamente el 5%-15% de los casos de LLC al momento del diagnóstico o antes del tratamiento de primera línea y alrededor del 40% en casos refractarios al tratamiento con fludarabina (5, 6, 9, 14, 15), siendo causa de inestabilidad genómica en la célula leucémica (9, 13, 15, 16).

Es importante destacar que las mutaciones de *TP53* se asocian a tiempos cortos de progresión de la enfermedad, respuestas deficientes al tratamiento inmuno-quiimoterápico (fludarabina, ciclofosfamida y rituximab), independientemente de la presencia de deleción 17p (7, 17, 18). Esto hace que sea importante detectar tales mutaciones en el paciente con CLL antes de la decisión clínico-terapéutica (19).

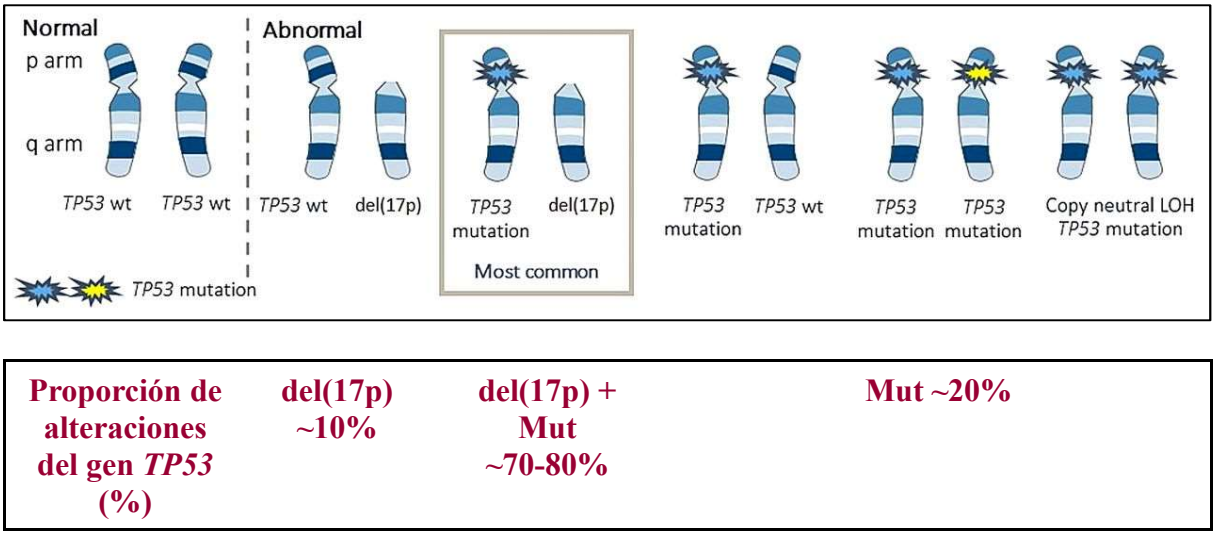


Figura 2: Mecanismos que conducen a la pérdida de la función del gen *TP53*. Modificado de Campo et al, 2018 (9).

En este contexto, el objetivo del presente proyecto se encontró dirigido al estudio de mutaciones del gen *TP53* en pacientes con LLC de nuestro país, tendiente a identificar las variantes más frecuentes presentes en nuestra serie. Los resultados obtenidos fueron correlacionados con los rearreglos genómicos, las alteraciones citogenéticas de la patología y el estado mutacional de IGHV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes.

Se analizaron 49 pacientes (29 hombres: edad media: 67,14 años, rango: 40-85 años; estadíos RAI: 0: 23,5%, I-II: 53,0%, III-IV: 23,5%). Las muestras fueron derivadas al Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina, y a la División Patología Molecular, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. El diagnóstico fue establecido de acuerdo con el International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia Criteria (16). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Todos los individuos dieron su consentimiento informado.

Análisis de mutaciones del gen *TP53*.

Para el análisis de mutaciones del gen *TP53*, se extrajo el ADN total con reactivo Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes y controles obtenidas con Ficoll-Hypaque. Se efectuaron cinco reacciones de PCR con primers que amplifican los exones 4 a 10 del gen *TP53* y los límites intron-exón, según las recomendaciones del TP53 Network of the European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia (ERIC), (20). Los resultados se compararon con bases públicas: IARC TP53 Mutation Database (http://www-p53.iarc.fr); la funcionalidad de la proteína resultante se evaluó con la base Seshat (https://p53.fr/tp53-database/seshat). La secuencia de los primers utilizados, el tamaño de los fragmentos amplificados y la temperatura de annealing de cada fragmento se detallan en la Tabla 1.

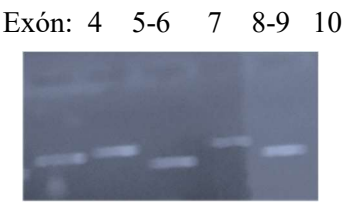
Tabla 1: Primers utilizados en las reacciones de PCR, tamaño del fragmento amplificado y temperatura de annealing.

Fragmento	Primer	Secuencia	Producto (pb)	Tº Annealing (ºC)
Exón 4	Ex 4 F	5´-TGAGGACCTGGTCCTCTGAC-3´	413	58
	Ex4 R	5´-AGAGGAATCCCAAAGTTCCA-3´		
Exones 5-6	Ex5-6 F	5´-TGTTCACTTGTGCCCTGACT-3´	467	58
	Ex5-6 R	5'-TTAACCCCTCCTCCCAGAGA-3'		
Exón 7	Ex7 F	5'-CTTGCCACAGGTCTCCCCAA-3'	237	69
	Ex7 R	5'-AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA-3'		
Exones 8-9	Ex8 -9 F	5'-TTGGGAGTAGATGGAGCCT-3'	445	58
	Ex8-9 R	5'-AGTGTTAGACTGGAAACTTT-3'		
Exón 10	Ex10F	5´-CAATTGTAACTTGAACCATC-3´	260	54
	Ex10R	5´- GGATGAGAATGGAATCCTAT-3´		

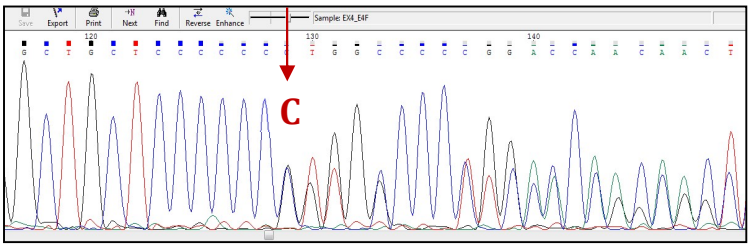
Las condiciones de ciclado fueron: 3 min a 95ºC, seguidos de 40 ciclos a 95ºC durante 30 segundos, temperatura de annealing correspondiente según cada fragmento amplificado durante 45 segundos, 72ºC durante 45 segundos, alargamiento a 72ºC durante 10 min. La técnica presentada fue la elegida después de varios ajustes, por ser la que arrojó resultados óptimos.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Bromuro de Etidio y visualización bajo luz UV. Los productos de PCR fueron purificados por extracción a partir del gel de agarosa y secuenciado en forma bidireccional por el método de Sanger (Figura 3 A y B). Los resultados se compararon con bases públicas: IARC TP53 Mutation Database (http://www-p53.iarc.fr) y la funcionalidad se evaluó con la base de datos Seshat (https://p53.fr/tp53-database/seshat). Solo las variantes patológicas fueron consideradas.

A)



B)



Caso 1: c214_214ins1 (insC)

Figura 3: A) Gel de agarosa al 3% mostrando los productos de amplificación por PCR. B) Secuenciación automática

Análisis del estado mutacional del gen IGHV.

Se efectuó extracción de ARN total a partir de CMSP de pacientes y controles obtenidas con Ficoll-Hypaque, utilizando el método de Trizol-cloroformo seguido de una purificación con isopropanol. El ARN se cuantificó espectofotométricamente. La síntesis de ADNc total se efectuó por RT-PCR a partir de 0,5 µg de ARN usando random-primers (Biodynamics).

La amplificación del ADNc se realizó mediante seis reacciones de PCR, utilizando en cada caso un primer forward ubicados en la región líder consenso específico de cada familia (LH1-LH6) (21, 22). Las condiciones de ciclado fueron: 7 minutos a 95ºC, seguidos de 35 ciclos a 95ºC durante 45 segundos, 62ºC durante 45 segundos, 72ºC durante 1,30 minutos, alargamiento a 72ºC durante 10 minutos. Una vez que la familia involucrada en el rearreglo fue identificada, el producto de PCR fue purificado por extracción a partir del gel de agarosa al 3% y secuenciado en forma bidireccional por el método de Sanger. Las secuencias se compararon con la línea germinal utilizando las bases de datos IMGT-VQuest e Igblast, a fin de determinar los genes IGHV, IGHD e IGHJ responsables del rearreglo, el porcentaje de homología y el estado mutacional.

Análisis de la presencia de BCRs estereotipados.

Para el análisis de subsets, se alinearon las secuencias de aminoácidos (aa) de la región VH CDR3 entre los codones 107 y 117 con las secuencias de subsets previamente publicadas (23, 24) usando Clustal Ω. Se determinó el score de alineamiento múltiple (SAM) como el valor medio de todos los pares de alineamientos entre la secuencia incógnita y las secuencias del subset. Para la definición de subsets se utilizaron los siguientes criterios: uso de los mismos rearreglos D-J, secuencias con una diferencia en longitud ≤3 aa, aún con genes IGHV distintos y SAM mayor o igual al 60%. Se utilizó además el criterio de Agathangelidis et al (2012) (25) para identificar subsets mayores, definidos como tales por ser los más frecuentes, por medio de la herramienta bioinformática ARResT/AssignSubsets. En este caso solo las secuencias reordenadas que portan genes IGHV del mismo clan (sea: I, II o III), pueden asignarse al mismo grupo. Dichas secuencias deben además tener: idénticas longitudes de la región VH CDR3, posiciones exactas de los aa compartidos dentro de esta región y poseer al menos el 50% de identidad y 70% de semejanza en los aa.

Análisis citogenético y FISH (*fluorescence in situ hybridization*).

Se realizó estudio citogenético de linfocitos de sangre periférica, cultivados durante 72 hs a 37°C en medio F-12 suplementado con 15% de suero fetal bovino, estimulados con Pokeweed Mitogen y Oligo DSP30. Se utilizó la técnica de bandeo G y la nomenclatura establecida en el ISCN (International System for Human Cytogenetics Nomenclature) (26).

Para el análisis de FISH, los extendidos fueron hibridados con el panel de sondas de LLC: SE12, OLE13q14 (D13S319), OLE11q22.3 (ATM) y 17p13.1 (TP53) (LIVE-LEXEL, Buenos Aires, Argentina), de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. Se analizaron doscientos núcleos interfásicos para cada sonda por individuo. Los puntos de corte para los valores positivos (media del control normal + 3 desviaciones estándar), determinados a partir de diez individuos normales fueron los siguientes: 3%, 10%, 7,5% y 5,5%, para trisomía 12, deleciones de D13S319, ATM y TP53, respectivamente. (27).

Análisis estadístico.

El análisis de las variables de laboratorio se realizó utilizando el test `t´ de Student (para las variables cuantitativas) y la prueba de Chi cuadrado o el Test Exacto de Fisher (para variables categóricas). Para todas las evaluaciones se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p<0,05$. Los resultados se analizaron empleando el programa IBM SPSS Statistics 24.

RESULTADOS

En nuestro laboratorio efectuamos el análisis de la presencia de mutaciones del gen *TP53* en una cohorte de 49 pacientes con LLC. En la Tabla 1 se detallan las mutaciones del gen *TP53* observadas, el estado mutacional de IGHV así como los estudios citogenéticos y de FISH realizados.

Se encontraron 12/49 casos (24,5%) con *TP53* mutado (*TP53*-M) con la siguiente distribución: 1 en el exón 4 (7,1%), 1 en el intrón 5 (sitio de splicing, 7,1%), 1 en el exón 6 (7,1%), 3 en el exón 7 (21,5%), 3 en el exón 8 (21,5%) y 5 en el exón 5 (35,7%). Un paciente (Caso 36) presentó tres mutaciones concomitantes. Se observaron 2 inserciones y 2 deleciones (4/14; 28,6%), tres con cambio del marco de lectura (frameshift), y 10 mutaciones puntuales (10/14; 71,4%), 1 en el sitio de splicing (7,1%) y 9 con cambio de sentido (64,3%): 7 transiciones y 3 transversiones, una en el sitio CpG. (Figura 4). Las mutaciones encontradas mostraron la distribución topológica característica del gen, con el 92,9% (13/14) de las mismas ubicadas en el dominio de unión al ADN (exones 4-8).

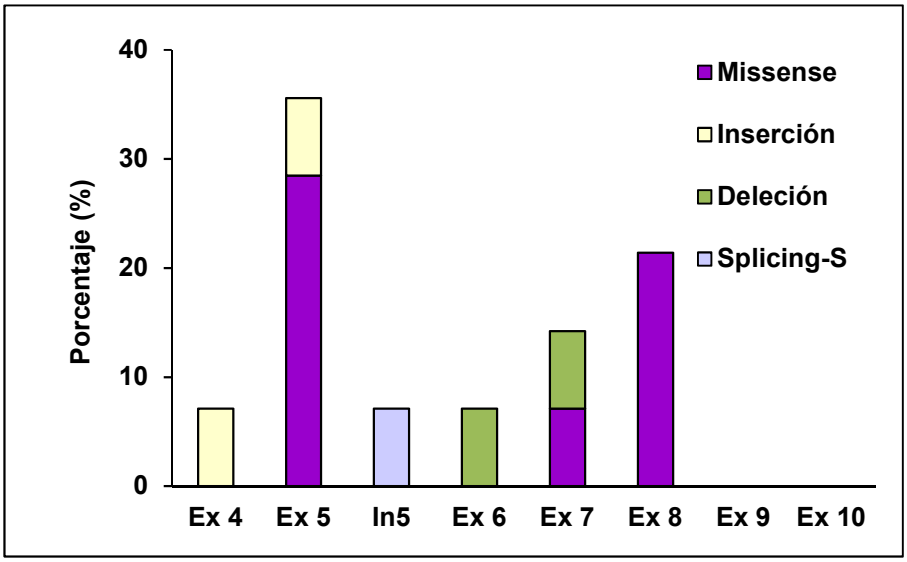


Figura 4: Distribución topológica de las mutaciones de *TP53* considerando el subtipo molecular. Ex: Exón; In: Intrón; Splicing-S: Splicing-site.

Tabla 1: Análisis de mutaciones en los genes *TP53* e IGHV, estudio citogenético y FISH.

Nº	Exón/Intrón Codón	Mutación	cDNA	Proteína	aa WT	aa mutado	IGHV	% Homol	IGHV M/NM	CIT	FISH 17p
1	4/73	In-fs	c214_214ins1(insC)	pV72FS	Val	-	3-74*01	100	NM	CS	35,1
2	5/156	Mi-TV	c467G-C	pR156P	Arg	Pro	3-48*03	98,8	NM	CC	72
3	NM	NM	-	-	-	-	3-30*01	91,4	M	-	-
4	NM	NM	-	-	-	-	4-34*01	95,6	M	N	6,7
5	NM	NM	-	-	-	-	4-4*07	100	NM	N	6,4
6	NM	NM	-	-	-	-	4-34*03	98,8	NM	-	-
7	5/157	In-fs	c469_472ins4	pV157fs (insTCCG)	Val	-	3-48*03	100	NM	-	24,4
8	I5/164-1	SS-TS	c560-1G>A	-	-	-	-	-	-	CS	88
9	NM	NM	-	-	-	-	4-34*01	98,8	NM	N	8,7
10	NM	NM	-	-	-	-	4-69*03	95,0	M	CS	6,3
11	NM	NM	-	-	-	-	1-69*01	100	NM	CS	77,3
12	NM	NM	-	-	-	-	3-23*01	100	NM	-	6,29
13	NM	NM	-	-	-	-	3-7*01	98,4	NM	CS	10
14	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	-	6,2
15	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	-	5,7
16	NM	NM	-	-	-	-	3-23*01	95,8	M	-	13
17	6/209	del-fs	c625_626del2 (GA)	pR209fs	Arg	-	5-10*01	99,6	NM	CC	20,25
18	7/248	Mi-TS	c742C>T	pR248W	Arg	Trp	1-69*01	100	NM	-	0
19	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	NM	NM	-	-	-	-	1-18*01	87,3	M	-	-
21	NM	NM	-	-	-	-	1-69*01	100	NM	-	6,9
22	8/272	Mi-TS	c.814G>A	pV272M	Val	Met	3-7*03	93	M	CS	60
23	8/279	Mi-TS	c.836G>A	pG279E	Gly	Glu	1-2*04	100	NM	CS	25
24	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	N	7,24
25	NM	NM	-	-	-	-	5-51*01	96,9	M	N	6,9
26	NM	NM	-	-	-	-	3-21*01	99	NM	-	6
27	NM	NM	-	-	-	-	3-48*01	100	NM	-	-
28	7/247	del	c.740_754delACCGGAGGCCCATCC	p.Asn247_Ile251de	-	-	-	-	-	-	20,6
29	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	5/163	Mi-TV	c.487T>A	pT163N	Thr	Asn	-	-	-	CS	32,5
31	NM	NM	-	-	-	-	3-23*01	91,0	M	-	-
32	NM	NM	-	-	-	-	3-11*01	100	NM	CS	8,7
33	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	N	-
35	NM	NM	-	-	-	-	3-23*01	95,8	M	N	14,5
36	5/131 5/152 8/276	Mi-TV Mi-TS Mi-TV	c.392A>T c.454C>T, c.826G>C	p.Asn131Ile p.Pro152Ser p.Ala276Pro	Asn Pro Ala	Ile Ser Pro	-	-	-	-	0
37	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	NM	NM	-	-	-	-	3-66*01	99,5	NM	CS	0
39	NM	NM	-	-	-	-	1-69*01	100	NM	CC	0
40	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	NM	NM	-	-	-	-	3-23*01	92,4	M	.	.
42	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	NM	NM	-	-	-	-	3-74*01	97,2	M	-	-
44	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	NM	NM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	NM	NM	-	-	-	-	4-34*01	92,8	M	-	-
47	7/259	Mi-TS	c.776A>G	p.Asp259Gly	Asp	Gly	-	-	-	-	0
48	NM	NM	-	-	-	-	3-7*03	95,0	M	-	0
49	NM	NM	-	-	-	-	3-33*01	100	NM	-	-

In: insersión; del : deleción; I: intrón ; SS: splice site; fs: frameshift; Mi: missense; TV: transversión; TS: transición; aa: aminoácido; WT: wild type; IGHV: immunoglobulin heavy chain variable región; M: Mutado; NM: No mutado; Homol: Homología; CIT: citogenético ; CS: cariotipo simple ; CC: cariotipo complejo; N: normal.

En 32 pacientes se efectuó el análisis de IGHV; 85,7% (6/7) de los casos con *TP53*-M presentaron IGHV NM mientras que 14,3% (1/7) presentó IGHV M, no se alcanzó significación estadística entre la presencia de mutaciones de *TP53* y el estado mutacional de IGHV (p=0,195). Se observó la presencia de BCRs estereotipados en 12,5% (4/32) de los casos analizados (Tabla 2). El Caso 4 presentó un rearreglo V4-34*01 M asignado al subset #4 de buen pronóstico coincidiendo con *TP53*-NM. El caso 26 presentó un rearreglo V3-21*01 NM asignado al subset #2 de pronóstico adverso pero conservó *TP53*-NM.

Tabla 2: Análisis de la presencia de BCRs estereotipados en los pacientes con LLC

Caso Nº	IGHV	IGHD	IGHJ	% homología	Estado mutacional	Stamatopoulos/ Bomben (23-24) (SAM)	Agathangelidis (25) Subsets mayores
4	4-34*01	5-18*01	J6*02	95,6	M	4 (81,2)	4
18	1-69*01	3-3*01	J6*02	100	NM	3 (74,2)	3
21	1-69*01	3-3*01	J6*02	100	NM	9 (70,9)	-
26	3-21*01	3-22*01	J6*02	99	NM	2 (75)	2

M: mutado, NM: no mutado

Nueve de los 12 casos (75%) con *TP53*-M presentaron además del17p13 por FISH; resulta importante remarcar que los 3 pacientes restantes (25%) mostraron ausencia de la deleción (1 de ellos tenía ambos alelos mutados y 3 mutaciones concomitantes, Paciente 36). En todos los casos donde se observaron ambas aberraciones*: TP53*-M y del17p13, los porcentajes de deleción por FISH fueron superiores al 20%, con una media de 38,9%, significativamente mayor que la observada en pacientes con *TP53*-NM (11,56%) (p=0,015) (Figura 5). El análisis citogenético mostró alteraciones cromosómicas en 100% de los casos con *TP53*-M respecto del 65% de los NM.

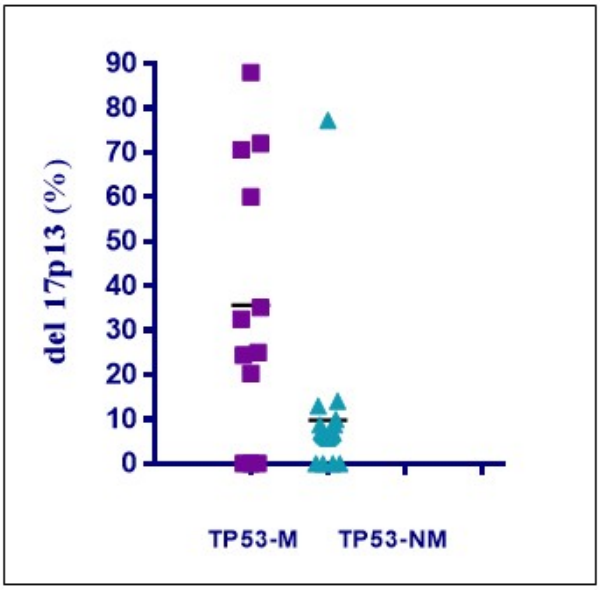


Figura 5: Porcentaje de deleción 17p13 en pacientes con el gen *TP53*-M y NM.

DISCUSIÓN

El análisis molecular del gen *TP53* detectó la presencia de mutaciones en 24,5% de los pacientes evaluados. Acorde a lo descripto en la literatura (14), las mutaciones de nuestra cohorte mostraron la distribución característica dentro del gen, con el 92,9% de las mismas ubicadas en el dominio de unión al ADN (exones 4-8), siendo su mayoría missense (71,4%) con una sola en el sitio CpG.

Coincidiendo con la literatura (9), 75% de los casos (9/12) con *TP53*-M presentaron del17p13 por FISH. Es necesario enfatizar que 25% de los pacientes con *TP53*-M (3/12) mostraron ausencia de la deleción.

Si bien, solo se informaron las variantes patogénicas del gen *TP53*, uno de los pacientes (Caso 47) presentó una mutación descripta, sin embargo la investigación publicada y el análisis de la base de datos no proporcionan evidencia suficiente para la clasificación de esta variante de codificación como patogénica o benigna. Es preciso revisar la base de datos en forma periódica para ver si se agregan evidencias que aclaren esta situación dado que el paciente hasta el presente mostró ausencia de deleción 17p13 por FISH, no pudiendo definir si existen o no alteraciones del gen *TP53*.

La presencia de aberraciones genómicas y el estado mutacional de IGHV son considerados como importantes factores de riesgo en esta patología. Si bien no se logra significación estadística, la mayoría (85,7%) de los pacientes con *TP53*-M presentan IGVH NM, ambos marcadores de mal pronóstico. Además, el caso 26 presentó un rearreglo V3-21*01 NM asignado al subset #2 de pronóstico adverso con *TP53*-NM, este dato coincide con la literatura donde se demuestra que los pacientes con BCREs asignados a subset #2 de homología a pesar de su pronóstico adverso, presentan baja frecuencia de mutaciones del gen *TP53*. Asimismo, el paciente 4 utilizó en su rearreglo el fragmento IGHV4-34 que se asignó al subset #4 de buen pronóstico, y se asoció a *TP53*-NM, resultados en concordancia con los datos publicados (28). El análisis citogenético mostró alteraciones cromosómicas en 100% de los casos con *TP53*-M respecto del 65% de los NM.

Considerando que la técnica de FISH detecta sólo las deleciones no las mutaciones (17, 18), resulta necesaria la búsqueda de mutaciones, utilizando la secuenciación de Sanger o técnicas de secuenciación de última generación (NGS). Si bien la secuenciación de Sanger convencional es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la presencia de mutaciones en el gen *TP53* en la práctica clínica y constituye una técnica accesible, tiene un límite de detección para alelos mutados de 10-15%, careciendo de sensibilidad para detectar subclones menores que albergan mutaciones de este gen. Por el contrario, la técnica de NGS permite la detección de clones menores mutados, con frecuencia alélica aún por debajo del 1%. Además, se ha demostrado que los subclones menores de *TP53*-M tienen valor pronóstico desfavorable, similar al de los clones mayores (11, 15). Sin embargo, el nivel recomendado para reportar mutaciones por NGS es cercano al límite de detección de la técnica de Sanger (10%), más estudios clínicos prospectivos resultan necesarios para validar el significado clínico de las mutaciones con frecuencia alélica menor de 10% indetectables por secuenciación de Sanger (9, 13). En este sentido, se encuentra en curso un estudio multicéntrico del ERIC (European Research Initiative on CLL) (29).

Resulta de interés destacar que el análisis secuencial de la del17p13 y de mutaciones de *TP53* ha permitido demostrar la existencia de evolución clonal después del tratamiento, en la primera o subsiguientes recaídas (30). La mayoría de los clones menores de *TP53*-M se expanden y constituyen el clon dominante bajo la presión selectiva de la quimioterapia transformándose en un factor de impacto negativo en la evolución de la enfermedad. La adquisición de mutaciones nuevas en pacientes no tratados es rara (19, 31). La utilidad clínica del análisis de la mutación *TP53* en la LLC ha sido bien documentado por diferentes estudios incluyendo los hallazgos de ensayos clínicos prospectivos, siendo de importancia efectuarla antes de la iniciación de cada línea de tratamiento (31, 32).

Concluyendo, la detección de las deleciones y mutaciones del gen *TP53* se ha convertido en una parte integral del diagnóstico de rutina en LLC. El análisis de los exones 4-10 del gen es un requisito necesario, y puede ser realizado por secuenciación de Sanger bidireccional o secuenciación masiva. Estas anomalías conducen al uso obligado de terapias con mecanismos de acción independientes de p53, con drogas que inhiben la señalización de células B y BCL2 anti-apoptótica (23). Varios agentes terapéuticos relativamente nuevos han demostrado una mejora en la evolución clínica de los pacientes con LLC con mutaciones del gen *TP53* (22, 24). Dado que las mutaciones de *TP53* pueden ocurrir de novo durante la recaída, se recomienda realizar su evaluación antes de iniciar la primera línea de tratamiento y todas las siguientes. Sin duda, la profundización de estos estudios permitirá lograr un mayor conocimiento de las causas de la variabilidad clínica presente en los pacientes con LLC, situación que hará factible mejorar la predicción del comportamiento de la enfermedad en el marco de una medicina personalizada.

REFERENCIAS

1. Smith A, Howell D, Patmore R, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. Br J Cancer. 2011; 105:1684-92.
2. Van Dyke DL, Werner L, Rassenti LZ, y col. The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. Br J Haematol 2016; 173: 105-13.

3. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 15: 1840-7.

4. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94:1848-54.

5. Zenz T, Kröber A, Scherer K, y col. Monoallelic. TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. Blood. 2008; 112: 3322-9.

6. Zenz T, Häbe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Bühler A, y col. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. Blood. 2009; 114: 2589-97.

7. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, y col. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. Clin Cancer Res 2009; 15: 995–1004.

8. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, y col. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. J Clin Oncol. 2011; 29: 2223-9.

9. Campo E, Cymbalista F, Ghia P, y col. *TP53* aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. Haematologica 2018; 103: 1956-68.

10. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, y col. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol 2010; 28: 4473–9.

11. Rossi D, Khiabanian H, Spina V, y col. Clinical impact of small *TP53* mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2014; 123: 2139-47.

12. Nadeu F, Delgado J, Royo C, y col. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2016; 127: 2122-30.

13. Malcikova J, Pavlova S, Kozubik KS, y col. TP53 mutation analysis in clinical practice: lessons from chronic lymphocytic leukemia Hum Mutat. 2014; 35: 663-71.

14. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, y col. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. Leukemia. 2010; 24; 2072-9.

15. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, y col. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2015; 29: 877-85.

16. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, y col. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. Blood 2018; 131: 2745–60.

17. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, y col. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and

is highly correlated with a complex aberrant karyotype. Leukemia 2009; 23: 117-24.

18. Hallek M, Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. Am J Hematol 2019; 94: 1266-87.
19. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, y col. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 2012; 26: 1458-61.
20. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, y col. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation. Leukemia. 2018; 32: 1070-80.
21. Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK - Ig VH gene utational patterns indicate different tumor cell status in human myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. Blood 1996; 87:746-55.
22. van Dongen JJ, Langerak A, Bru¨ggemann M, et al.Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003; 17, 2257–317.
23. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. Blood 2007; 109: 259-70.
24. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. Br J Haematol 2009; 144: 492-506.
25. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. Blood 2012; 119: 4467-75.
26. ISCN. *An International System for Human Cytogenomic Nomenclature.* (2016) McGowan-Jordan, J., Simons, A. and Schmid, M. (eds). Karger, Basel.
27. Palmitelli M, Stanganelli C, Stella F, et al. Analysis of basal chromosome instability in patients with chronic lymphocytic leukaemia. Mutagenesis 2019; 34: 245-52.
28. Sutton LA, Young E, Baliakas P et al. Different spectra of recurrent gene mutations in subsets of chronic lymphocytic leukemia harboring stereotyped B-cell receptors. Haematologica 2016; 101:959-67.
29. EP659. Interlaboratory comparison of NGS methods for detection of TP53 variants <10% VAF: the first phase of an ERIC multicenter stydy on the clinical impacxt of low-frequent TP53 variants in CLL. Pavlova S, Malcikova J, Radova L, Bonfiglio S, Sutton L.-A., Brieghel C , et al.Hemasphere EHA 25 Abstracts.
30. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, y col. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. Nature 2015; 526: 525-30.
31. Nadeu F, Clot G, Delgado J, y cols. Clinical impact of the subclonal architecture and mutational complexity in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 2018; 32: 645-53.

32. Buccheri V, Barreto WG, Fogliatto LM, Capras M, Marchianis M, Rocha V. Prognostic and therapeutic stratification in CLL: focus on 17p deletion and p53 mutation. Ann Hematol. 2018; 97: 2269-78.

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a clinically heterogeneous disease. The mutations of the tumor suppressor gene TP53 (tumor protein P53) and/or the deletions of 17p13 (del17p13), where this gene maps, are prognostic and predictive markers of survival and response to treatment, essential for the management of the disease. *TP53* mutations were analyzed in 49 Argentinian patients with CLL, by PCR reaction of exons 4-10 and bidirectional sequencing. *TP53* (*TP53*-M) were found in 24.5% of patients: 1 in exon 4 (7.1%), 1 in intron 5 (splicing site, 7.1%), 1 in exon 6 (7.1%), 3 in exon 7 (21.5%), 3 in exon 8 (21.5%), and 5 in exon 5 (35.7%). One patient had three concomitant mutations. Two insertions and 2 deletions (28.6%), 3 with changes in the reading frame (frameshift), and 10 point mutations (71.4%) were observed, 1 at the splicing site (7.1%) and 9 with change of sense (64,3%): 7 transitions and 3 transversions, one at the CpG site. The mutations found showed the characteristic topological distribution of the gene, with 92.9% located in the DNA-binding domain (exons 4-8), In 32 patients the IGHV analysis was performed; 85.7% of the cases with *TP53*-M showed IGHV NM while 14.3%, IGHV M. Nine of the 12 cases (75%) with *TP53*-M also presented del17p13 by FISH, the remaining 3 patients (25%) showed absence of the deletion (1 of them had both mutated alleles and 3 concomitant mutations). In all cases where both aberrations were observed, the percentages of deletion by FISH were > 20%, with a mean of 38.9%, significantly higher than that observed in patients with *TP53*-NM (11.56%) (p=0.015). Cytogenetic analysis showed chromosomal alterations in 100% of cases with *TP53*-M compared to 65% of *TP53*-NM. As *TP53* mutations may occur *de novo* during relapse, their assessment should be performed before initiating the first and every subsequent line of therapy.

ROL DE LAS VARIANTES BACTERIANAS PERSISTENTES EN LA REFRACTARIEDAD AL TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO DURANTE LA OSTEOMIELITIS CRÓNICA CAUSADA POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Carlos Mauricio Suligoy Lozano

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica.
IMPAM - CONICET - UBA

EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

En primer término, se procedió a la caracterización de los aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus*, los cuales fueron obtenidos de investigaciones previas. A continuación, se llevó a cabo la identificación de los genes de resistencia a antibióticos mediante el análisis de secuencias de genoma completo.

Posteriormente, se seleccionaron dos conjuntos de aislamientos previamente caracterizados con el objetivo de investigar las propiedades relacionadas con la resistencia a antibióticos. Se realizó la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) para los antibióticos ciprofloxacina, gentamicina y vancomicina. Este análisis se llevó a cabo utilizando el método de microdilución, siguiendo las directrices del CLSI, para las cepas de S. aureus obtenidas de un paciente con osteomielitis crónica (HU14 SigB- y su par isogénico P3.1 SigB+).

Seguidamente, se procedió a la optimización del ensayo para la generación de variantes persistentes o "persisters" empleando las cepas HU14 y P3.1. Para lograr esto, se exploraron distintos porcentajes de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y diversos tiempos de exposición, con el fin de alcanzar un número óptimo de "persisters", cuantificando las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) en cada condición.

Se llevó a cabo un estudio sobre la formación de "persisters" en las cepas de laboratorio SH1000, la mutante SH1000 ΔsigB, HU14 y P3.1, con el propósito de elucidar el papel del factor SigB en la generación de variantes persistentes bajo condiciones estresantes. Los resultados indicaron que una condición estresante efectiva para obtener "persisters" fue la exposición al 1.5% de H_2O_2 (30 vol) durante 1 hora a 37°C con agitación. Sin embargo, al agregar otra condición estresante, como concentraciones elevadas (10xCIM) de un antibiótico, se observaron resultados inesperados. Se probaron antibióticos con diversos mecanismos de acción en concentraciones 10 veces la CIM, y no obstante, la población bacteriana sobrevivió en una cantidad similar al control sin tratamientos estresantes. Se especula que estos resultados inesperados podrían atribuirse a la alta capacidad adaptativa de la cepa HU14 y su par isogénico P3.1.

LOGROS Y/O METAS ALCANZADAS

Materiales y métodos.

Cepas bacterianas: Se utilizaron las cepas de *S. aureus* SH1000 y su mutante SH1000 ΔsigB y la cepa de *S. aureus* HU14 (SigB-) proveniente de un paciente con osteomielitis crónica y su par isogénico P3.1 (SigB+) (Suligoy, 2021). Las bacterias se crecieron en agar tripteína de soja (TSA) a 37ºC y se conservaron a -80ºC hasta su utilización.

Concentración inhibitoria mínima (CIM): La determinación de la CIM de los antibióticos ciprofloxacina, gentamicina y vancomicina se realizó mediante el método de microdilución siguiendo los lineamientos del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) para las cepas de *S. aureus* en estudio. Para ello, se realizaron diluciones seriadas al medio del antibiótico en caldo Mueller-Hinton (MHB) (volumen final=100 µl) en placas de 96 pocillos, tras lo cual se agregaron 100 µl de la suspensión bacteriana. ($5x10^5$ UFC/ml) en MHB. Como controles, se sembraron pocillos con la suspensión bacteriana sin tratamiento antibiótico y con medio MHB sólo. Transcurridas 18 h de incubación a 37ºC, se registró el desarrollo bacteriano mediante la lectura de la densidad óptica a 595 nm (DO_{595}) en un lector de microplacas (Multiskan EX). La menor concentración de antibiótico en la que no se detectó crecimiento bacteriano se consideró como el valor de la CIM para ese antibiótico y cepa ensayada.

Concentración bactericida mínima (CBM): A partir de la microplaca de lectura de la CIM, se tomó una alícuota (10 µl) de cada pocillo donde no se detectó crecimiento para ser sembrada en una placa de agar MH. Transcurridas 24 h de incubación a 37º C, se contaron las UFC, estableciéndose la CBM como aquella concentración en la que se observa el 0.01% de supervivencia del inóculo inicial.

Formación de "persisters": Se utilizó una suspensión similar al 0,5 Mc Farland de cada cepa para crecer en presencia de 1,5% de H_2O_2 (30 vol.) (tubos 1 y 2) y en presencia de PBS (control, tubos 3 y 4) durante 1h 37ºC a 200 rpm. Se centrifugó y el precipitado se suspendió en PBS. Posteriormente, se agregó una alícuota de la solución de antibiótico (concentración final igual a 10xCIM) a la suspensión bacteriana estresada con H_2O_2 del tubo 1 y a aquella no estresada del tubo 3. A los tubos 2 y 4 se agregó un volumen similar del vehículo. Los tubos se incubaron durante 1h 37ºC a 200 rpm. Luego se centrifugó y los precipitados se suspendieron en PBS. Finalmente, se sembraron alícuotas de diluciones seriadas en placas de agar TSA que se incubaron durante 24 hs a 37°C para la posterior cuantificación de las bacterias que sobrevivieron al estrés oxidativo. Las distintas condiciones fueron: con estrés de H_2O_2 y del antibiótico (tubo 1), sólo con estrés de H_2O_2 (tubo 2), sólo con estrés del antibiótico (tubo 3) y control (tubo 4). Las colonias de tamaño muy pequeño corresponden a las "persisters" (Vulin, 2018). La fracción de "persisters" fue calculada y analizada estadísticamente con GraphPad v7.0 (Balaban, 2019) y R.

RESULTADOS

Caracterización bioinformática de aislamientos de *S. aureus.*

La colección de 20 aislamientos clínicos de *S. aureus* utilizados en el presente trabajo provienen de estudios previos. La Tabla 1 recopila la información de cada uno de los aislamientos secuenciados recientemente.

Tabla 1: Detalle de los aislamientos de *S. aureus* provenientes de pacientes con diagnóstico confirmado de osteomielitis aguda o crónica de hospitales de Argentina.

Aislamiento	Evolución	Hospital	Tiempo de Evolución	Material	Lugar de secuenciación
HU-2	C	Clínicas San Martín	1 año	Biopsias de hueso	Broad Institute
HU-8	C	Clínicas San Martín	1 año	Absceso pretibial	Broad Institute
HU-14	C	Ramón Carrillo Pcia. Bs. As.	Sin información	Implante de fémur derecho	Broad Institute
HU-17	C	Clínicas San Martín	5 años	Punción lumbar	Broad Institute
HU-25	C	IIM Lanari	8 años	Punta de Catéter	Broad Institute
HU-29	C	IIM Lanari	2 años	Líquido articular	Broad Institute
HU-32	C	IIM Lanari	5 años	Líquido articular	Broad Institute
HU-35	A	IIM Lanari	7 días	Líquido Sinovial	Broad Institute
HU-50a	C	JM Cullen Santa Fe	Sin información	Hueso	Broad Institute
HU-55	C	JM Cullen Santa Fe	Sin información	Hueso	Broad Institute
HU-59a	A	Bancario C.A.B.A.	15 meses	Partes blandas profundas	Broad Institute
HU-73a	C	R Gutiérrez C.A.B.A.	2 años	Hueso	Broad Institute
HU-90a	C	Clínicas San Martín	1 año	Secreción endomedular	Broad Institute
HU-91	A	Clínicas San Martín	2 meses	Vértebra cervical	Broad Institute
HU-95a	C	Bancario C.A.B.A.	Sin información	Liquido articular	Broad Institute
HU-100	A	Bancario C.A.B.A.	6 meses	Punción de cadera	Broad Institute
HU-106	C	Clínicas San Martín	Sin información	Mucocele frontal	Broad Institute
HU-108	C	Clínicas San Martín	Sin información	Liquido articular	Broad Institute
HU-111a	C	Clínicas San Martín	Sin información	Secreción superficial	Broad Institute
HU-85a	A	Clínicas San Martín	1 semana	Hueso	University of Mississippi
HU-85c	A	Clínicas San Martín	13 meses	Hueso	University of Mississippi

A: Agudo, C: Crónico

Para proseguir con el análisis bioinformático, los genomas fueron ensamblados usando el software SPAdes y la calidad del ensamblado se evaluó con QUAST. Las características se describen en la Tabla 2.

Tabla 2: Características de los genomas ensamblados.

Aislamiento	Contigs	Longitud total	Contig mayor	% GC	N50
HU-95A	15	2880949	1404448	32.79	749325
HU-91	13	3023754	784028	32.90	502468
HU-90A	16	2981037	1135515	32.92	695809
HU-8	7	2961903	1572428	32.90	1572428
HU-73A	7	2773675	1556639	32.81	1556639
HU-59A	11	2926538	1604051	32.85	1604051
HU-55	17	2916019	1237568	32.82	596312
HU-50A	17	2861448	1544707	32.84	1544707
HU-35	7	2730435	1531756	32.84	1531756
HU-32	5	2735547	1531303	32.81	1531303
HU-2	7	2848173	1586469	32.83	1586469
HU-29	14	2802056	2075224	32.81	2075224
HU-25	22	2863244	1012830	32.80	684563
HU-17	20	2950121	1059121	32.82	566283
HU14	19	2992245	770815	32.82	499431
HU-111A	14	2845935	1009902	32.79	761454
HU-108	5	2736278	1543667	32.79	1543667
HU-106	5	2772935	2238991	32.81	2238991
HU-100	6	2742514	1696640	32.86	1696640

Luego se realizó la búsqueda de genes relacionados a resistencia a antibióticos con diferentes bases de datos y se realizó un "heatmap" para evaluar la presencia/ausencia y conservación de los genes a partir de las secuencias ensambladas. (Figura 1).



Figura 1: Presencia de genes de resistencia a antibióticos y la identidad en los diferentes aislamientos clínicos de *S. aureus*. En gris, los genes presentes en los genomas. Los genes y los tipos de grupos de familias de antibióticos son: *ant(9)-Ia* (espectomicina), *aph(2'')-Ih* (amicacina, gentamicina, kanamicina), *aph(3')-IIIa* (amikacina, kanamicina), *blaI_of_Z* (beta-lactámicos), *blaPC1* (beta-lactámicos), *blaR1* (beta-lactámicos), *blaZ* (beta-lactámicos), *erm(A)* (macrólidos), *fexA* (cloramfenicol), *fosB* (fosfomicina), *mecA* (meticilina), *rphC* (rifamicina), *sat4* (estreptotricina), *tet* (tetraciclina).

De los 19 aislamientos, 8 tienen genes de resistencia a aminoglicósidos, 9 a eritromicina y sólo uno a cloramfenicol. En total, 12 poseen el gen *mecA* y son SAMR. Los aislamientos HU-8, HU-17, HU-55, HU-59a, HU-90a, HU-91 y HU-95a son los que mayor cantidad de genes de resistencia a antibióticos presentan en su genoma, 11 en total cada uno, siendo HU-17 el único SAMS.

Caracterización fenotípica de resistencia a antibióticos.

En la Tabla 3 se muestran los valores de CIM obtenidos para los antibióticos ciprofloxacina, gentamicina y vancomicina para las cepas HU14 y P3.1.

Tabla 3: Valores CIM obtenidos para HU14 y P3.1.

Antibióticos	CIM (ug/ml) en cepas	
	HU14	P3.1
Ciprofloxacina	>2	>2
Gentamicina	>8	>8
Vancomicina	1	1

Los valores de CBM se correspondieron a los de CIM hallados en todos los casos.

Bajo condiciones de estrés, se observó que la cepa P3.1 presentó mayor resistencia al estrés oxidativo comparado con la cepa HU14 ($2.1x10^4$ UFC/ml *vs* $4.2x10^3$ UFC/ml, p=0.017 *t*-test). Para la mutante SH1000 ΔsigB, el número de bacterias viables fue significativamente más bajo ($2.2x10^2$ UFC/ml) en comparación con aquel observado en la cepa salvaje SH1000 ($6.5x10^3$ UFC/ml, p<0.01 *t*-test). Entre las cepas estudiadas y después de la exposición al H_2O_2 se observaron diferentes tamaños entre las colonias siendo las de tamaño más pequeño las denominadas "persisters". El tamaño de las colonias se analizó mediante los pixeles del área de cada colonia generada en las imágenes de las placas de TSA. Después de la condición estresante, el análisis del tamaño de las colonias de P3.1 mostró una distribución bimodal. El porcentaje de "persisters" observadas en las placas de P3.1 y SH1000 (88.8% y 61.7%, repectivamente) fue significativamente mayor que en las placas de HU14 y SH1000 Δ*sigB* (41.4% y 2.9%, p<0.001 t-test). Las "persisters" recobraron el tamaño de colonia promedio a lo largo del tiempo en ausencia de estrés.

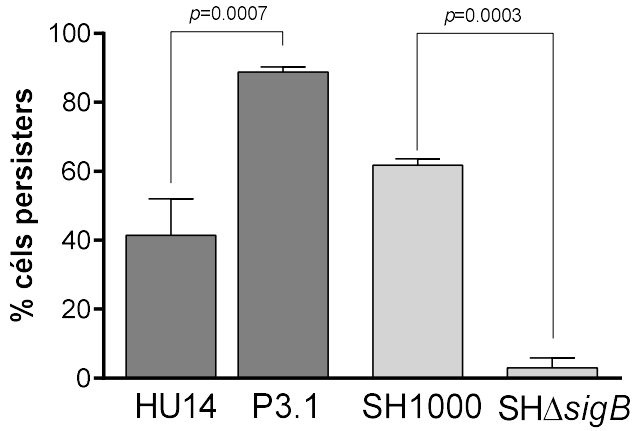


Figura 2: Porcentaje de bacterias persistentes sobre el total, comparando cepas isogénicas.

La cepa P3.1 es una derivada de HU14 obtenida luego de su pasaje por sangre que se adaptó a las condiciones estresantes de ese ambiente a través de una mayor expresión del factor sigB (Suligoy, 2020). En conclusión, la resistencia al estrés oxidativo mediada por SigB incrementó la aparición de "persisters".

CONCLUSIÓN

En conclusión, este estudio de 20 aislamientos de *S. aureus* destaca la diversidad genética y fenotípica en la resistencia a antibióticos en aislamientos clínicos. La formación de "persisters" bajo estrés y la expresión diferencial de SigB revelan la complejidad adaptativa de las cepas. Los resultados inesperados ante concentraciones elevadas de antibióticos subrayan la necesidad de comprender mejor los mecanismos de resistencia. La comprensión de la relación entre la resistencia a antibióticos, la formación de "persisters" y la expresión de factores específicos, como SigB, es esencial para el diseño de estrategias terapéuticas más efectivas. Estos hallazgos contribuyen significativamente al conocimiento de la biología y adaptabilidad de *S. aureus*, proporcionando una base para futuras investigaciones y el desarrollo de enfoques terapéuticos más precisos y eficaces.

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

SULIGOY S; CÁCERES ME; ROMERO R; SORDELLI DO; SULIGOY CM; BUZZOLA FR, "Oxidative stress resistance mediated by SigB increases the emergence of Staphylococcus aureus persister cells" Congreso; XVII Congreso Argentino de Microbiología General; 2022.

DIFICULTADES ENCONTRADAS EN LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en medio de la pandemia de SARS-CoV-2, imponiendo desafíos significativos para la ejecución y conclusión exitosa de los estudios. La situación epidemiológica, marcada por restricciones de movilidad y protocolos de seguridad, afectó directamente la disponibilidad de recursos y la dinámica de trabajo. La obtención de muestras y datos se vio comprometida debido a las medidas de distanciamiento social y las limitaciones en el acceso a instalaciones de laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Balaban N, Helaine S, Lewis K, Ackermann M, Aldridge B, Andersson D, Brynildsen M, Bumann D, Camilli K, Collins J, Dehio C, Fortune S, Ghigo J, Hardt W, Harms A, Heinemann M, Hung D, Jenal U, Levin B, Michiels J, Storz G, Ta M, Tenson T, van Melderen L and Zinkernagel A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. Nature Reviews Microbiology. 2019, 10.1038.
- Suligoy CM, Díaz RE, Gehrke AK, Ring N, Yebra G, Alves J, Gómez MI, Wendler S, Fitzgerald JR, Tuchscherr L, Löffler B, Sordelli DO, Noto Llana M and Buzzola FR. Non-encapsulated Staphylococcus aureus with a non-functional agr regains capsule expression after passage through the bloodstream in a bacteremia mouse model. Scientific Reports (2020) 10:14108.
- Suligoy CM, Lattar SM, Noto Llana M, Gonzáles C, Alvarez LP, Robinson DA, Gómez MI, Buzzola FR and Sordelli DO. Mutation of Agr is associated with the adaptation of Staphylococcus aureus to the host during chronic osteomyelitis. Front. Cell. Infect. Microbiol. (2018) 8:18.
- Vulin C, Leimer N, Huemer M, Ackermann M and Zinkernagel A. Prolonged bacterial lag time results in small colony variants that represent a sub-population of persisters. Nature Communications. 2018, 10.1038.

ABSTRACT

In this comprehensive study of 20 *Staphylococcus aureus* clinical isolates, genomic and phenotypic analyses showed diverse antibiotic resistance profiles. Identification of antibiotic resistance genes, showed distinctive patterns, notably the prevalence of mecA in 12 isolates designating them as MRSA. Phenotypic characterization, assessing Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) for specific antibiotics, provided insights into bacterial responses to those antibiotics. Notably, the unexpected outcomes under elevated antibiotic concentrations underscore the adaptive capacity and resistance mechanisms in specific strains, such as

HU14 and P3.1. The observed formation of "persisters" under oxidative stress and antibiotic exposure, coupled with varying SigB expression, highlights the intricate adaptability of strains, with implications for therapeutic strategies. This study enhances our understanding of *S. aureus* biology, emphasizing the need for tailored therapeutic approaches based on nuanced resistance patterns and adaptive responses.

BIOLOGÍA EN CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LAS PRIMERAS DOS GENERACIONES DE *NYSSOMYIA NEIVAI* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EN UNA COLONIA EXPERIMENTAL EN ARGENTINA

Enrique Szelag [1,2], Sofía Gómez Gallipoliti [1,2], Miriam Ellena [1,2], Juan Rosa [1]

[1] Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional de Nordeste. Chaco, Argentina. [2] Consejo Nacional del Investigaciones Científicas y Técnicas.

INTRODUCCIÓN

El primer caso de leishmaniasis en Argentina fue registrado en 1916 en la provincia de Tucumán (Bernasconi 1928). Cuatro décadas después, se registró la presencia de Phlebotominae en áreas de transmisión de leishmaniasis tegumentaria (LTA) en el norte del país en las provincias de Chaco, Catamarca, Corrientes, Formosa, Misiones, Jujuy, Salta, Santiago del Estero y Tucumán (Bejarano 1959, Salomón et al. 2008). Desde entonces, se citaron 46 especies en 14 provincias Argentinas, 19 de ellas registradas en la provincia del Chaco (Moya et al. 2022). Las especies con mayor importancia en el Bioma Chaqueño, tanto por su abundancia como por su interés epidemiológico, son *Nyssomyia neivai*, *Migonemyia migonei* y la Serie cortelezzii (Szelag et al. 2018).

Nyssomyia neivai, es considerada como el vector epidémico de LTA en Argentina (Salomón et al. 2008, Santini and Salomon 2012) hallándola naturalmente infectada con ADN de *Leishmania* spp. por primera vez en Argentina en la provincia de Tucumán (Córdoba-Lanús et al. 2006). A fin de comprender el comportamiento del parásito en el díptero, es necesario emprender estudios de su biología en condiciones experimentales con diversos fines. En Argentina, los primeros registros de la biología en condiciones experimentales de Phlebotominae fueron realizados en la provincia de Corrientes con *Ny. neivai* y *Mg. migonei*. (Rosa et. al. 1999). En la provincia del Chaco, en cambio, no existen antecedentes de estudios de flebotomínos en condiciones de laboratorio siendo éste el motivo de la realización de la experiencia con *Ny. neivai* como probable vector en áreas de transmisión de LTA en un área periurbana de la ciudad de Resistencia, provincia del Chaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *Ny. neivai* se capturaron en la provincia del Chaco (27º26´S y 58°51´O), a 8 km de la ciudad de Resistencia capital provincial, en dos viviendas distantes a 1 km entre sí, en selva ripiara, correspondiente al valle de inundación del río Paraná. Se completaron en total 10 muestreos de Phlebotominae en el Área de Puerto Antequera, Chaco. Los muestreos se realizaron durante dos noches consecutivas en los meses de noviembre, diciembre 2019; febrero, octubre, noviembre 2020; febrero, marzo y abril de 2021.

Se utilizaron trampas de luz CDC con permanencia de 12 hs, de 19:00 a 07 hs; en el domicilio, peridomicilio y extradomicilio (habitaciones gallinero/porqueriza y selva). Al día siguiente los ejemplares se transportaron al laboratorio y se transfirieron en jaulas de nylon de 20 cm^3 para la alimentación sanguínea de las hembras.

Las hembras alimentadas se distribuyeron individualmente en recipientes de plástico de 4 cm de diámetro con la base de yeso humedecida con algodón mojado con agua destilada. Se tapó con tela nylon en cuya superficie se colocó un trozo de algodón húmedo con solución azucarada (agua destilada \ miel de abejas 1:1) como fuente de azucarada para los flebotomínos, que fue reemplazada diariamente.

Se conformaron grupos de diez recipientes en cajas plásticas de 38 x11 cm, que se ubicaron en una caja de polipropileno expandido de 40 x 30 cm con recipiente de agua para generar una cámara húmeda. Las cajas se mantuvieron en el insectario del Instituto de Medicina Regional (UNNE) a una temperatura promedio 25°C (±2ºC) y humedad relativa promedio de 80% (±10%).

La metodología empleada para el mantenimiento de la colonia se basó en los trabajos de Killick-Kendrick et al. (1977) y Rangel et al. (1985). A fin de monitorear la oviposición, las hembras se observaron diariamente, al morir los adultos se retiraron y conservaron en alcohol 70% hasta su clarificación y montaje en Berlesse, según técnica descripta por Forattini (1973). Posteriormente fueron identificados mediante las claves propuestas por Galati (2019).

Los recipientes con huevos se controlaron diariamente hasta la emergencia de las larvas de primer estadio. Éstas se alimentaron con una ración en polvo preparada en el laboratorio formada por partes iguales de helecho arbóreo, heces secas de conejo, lechuga deshidratada y alimento para peces tropicales (Andrade et al. 2004). El control diario de los diferentes estadios larvales y el pupal se realizó bajo estereomicroscopio hasta la emergencia de los adultos, los que se cuantificaron y se transfirieron a otro recipiente de mayor tamaño formando la siguiente generación (F1). El monitoreo comprendió también el control de la proliferación de hongos y presencia de ácaros y remoción de exceso de alimento.

RESULTADOS

Se capturaron en total en los distintos periodos 278 hembras vivas de Phlebotominae, de las cuales 148 fueron identificadas como *Nyssomyia neivai*, 75 complejo cortelezzii y 55 *Migonemyia. migonei.*

De las 148 hembras de *Ny. neivai* 75 (50.6%) se expusieron a alimentación sanguínea. Se alimentaron 29 (38.66%) que formaron la filial parental (F0), de las cuales ovipusieron 14 hembras (48.27%). El total de huevos puestos fue de 421 con promedio de 38.27 huevos/hembra (max 65 – min 5 huevos). El ciclo biológico finalizó con la eclosión de 127 adultos, 65 machos y 62 hembras.

De éstas 62 hembras provenientes de la F0, se logró un repasto sanguíneo en 15 (33.33%) de las cuales se obtuvo una F1 a partir de 457 huevos con promedio de 30.46 huevos/hembra.

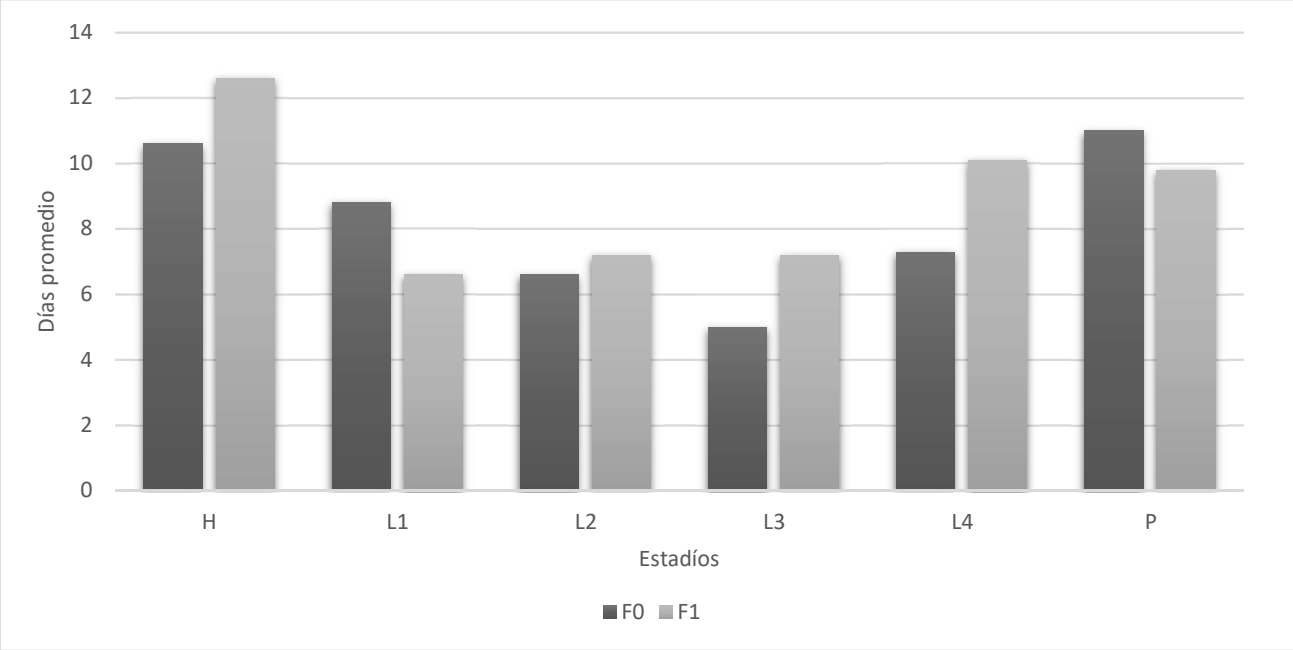
En las primeras filiales el ciclo biológico tuvo una duración promedio de 47.27 días para F0 y 45.87 días para F1.

El número promedio de días registrados para cada estadio en ambas filiales (F0/F1) fue de 10.6/12.6 para los huevos, Larva I 8.8/6.6, Larva II 6.6/7.2, Larva III 5/7.2, Larva IV 7.3/10.1, Pupa 11/9.8 (**Figura I**).

De la F1 eclosionaron 108 adultos (84 machos y 24 hembras), no pudiendo avanzar a otra filial por las restricciones abajo mencionadas. La razón de sexo (M:H) fue de 1.01:1 para F0 y 3.5:1 en la F1. En ambas generaciones los machos eclosionaron 2 a 3 días antes que las hembras.

Durante 2020 y 2021, se capturaron el total de hembras restantes sin poder estabilizar las colonias por restricciones operativas.

Figura I: Duración en días de cada estadío del ciclo evolutivo de dos generaciones de *Ny. neivai* en laboratorio en Resistencia. Chaco. Argentina.



DISCUCIÓN

El mantenimiento de una colonia de flebotomínos en condiciones experimentales permite estudiar aspectos relacionado a la biología de vectores, su capacidad vectorial, la genética de los vectores y parásitos con fines epidemiológicos y de control, ente otros tópicos relevantes. A su vez, ayuda a determinar las mejores técnicas y condiciones de desarrollo, para lograr la masificación de las colonias con fines experimentales. Si bien los factores abióticos, como la humedad y temperatura podrían afectar en mayor medida el ciclo biológico, también son importantes aquellos factores bióticos, como el alimento larval, la fuente sanguínea, o la posible interacción con otros organismos simbiontes o parásitos como lo son hongos, bacterias y protozoos (Andrade et al. 2004). El presente trabajo mostro que incluso bajo las mismas condiciones ambientales, las generaciones pueden mostrar pequeñas variaciones en su crecimiento, aunque son necesarias mayores replicas para demostrar si estas diferencias son estadísticamente significativas.

Se observó que las hembras de *Ny. neivai* que sobrevivieron a la oviposición no se alimentaron ante una segunda exposición al hámster, coincidiendo con lo descrito por Andrade et al. (2004), a diferencia de lo observado para otras especies próximas como *Ny. intermedia* que aparte de sobrevivir a la oviposición podría ser susceptible a una segunda alimentación sanguínea aumentando así su capacidad vectorial.

Si bien el promedio de huevos por hembra fue inferior a los reportados por otros autores, la duración completa del ciclo en condiciones controladas fue comparable rondando los 45 días promedio (Andrade et al. 2004, Copa et al. 2021). A su vez, los estadios de desarrollo evolutivo más extensos, correspondieron a la fase de huevo y pupa en ambas generaciones, aunque en la F1 se observó que también la L4 podría perdurar mayor tiempo como lo observado por (Andrade et al. 2004, Copa et al. 2021). Los machos emergieron antes que las hembras y no se observó diferencia en la razón de sexos macho/hembra en la generación parental, (1.04:1) pero se triplico en la F1 (3.5:1). Es conocido en otros insectos que el aumento de la proporción de uno de los sexos sería una forma de asegurar la fecundación a modo de perpetuar la especie, a su vez, la emergencia temprana de los machos da tiempo para la rotación de la genitalia, y al emerger las hembras, los machos están aptos para la cópula (Forattini 1973). Por otro lado, es necesario mencionar que es difícil comparar los resultados obtenidos, dada la alta variabilidad entre individuos y al bajo número de replicas, no pudiendo determinarse si las diferencias y similitudes observadas con otros autores podrían tratarse de características propias de la población de origen, o incluso diferencias metodológicas del mantenimiento de colonias. Finalmente, se destaca la necesidad de estandarizar los promedios de temperatura y humedad relativa en el ambiente de cría para cada especie a fin de realizar estudios comparables entre distintas poblaciones de origen, como también la calidad y productividad asociada a las diferentes propuestas de ración de alimentación para las fases larvarias.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, J. D., E. a B. Galati, and a L. Falcao. 2004. Biology of the first generation of a laboratory colony of Nyssomyia intermedia (Lutz & Neiva, 1912) and Nyssomyia neivai (Pinto, 1926) (Diptera : Psychodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99: 597–601.
- Bejarano, J. F. R. 1959. Complejo patógeno de la leishmaniasis en la republica Argentina, pp. 805–832. *In* Bejarano, J.R., De Ponte, E., Orfila, R. (eds.), Prim. Jornadas Entoepidemiológicas Argentinas. La prensa Médica Argentina, Buenos Aires.
- Bernasconi, V. . 1928. Contibucion al estudio de la distrubución geográfica de la leishmaniasis en la República Argnetina. Boletín del Inst. Clínica Quirúrgica Buenos Aires. 15: 325–328.
- Copa, G. N., M. C. Almazán, T. M. Goulart, M. C. Pinto, D. Marco, J. R. Nasser, and J. F. Gil. 2021. Initiation of Nyssomyia neivai and Migonemyia migonei (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) colonies under laboratory conditions from wild blood fed females in northwest Argentina. Int. J. Trop. Insect Sci. 41: 3065–3074.

- Córdoba-Lanús, E., M. L. De Grosso, J. E. Piñero, B. Valladares, and O. D. Salomón. 2006. Natural infection of Lutzomyia neivai with Leishmania spp. in northwestern argentina. Acta Trop. 98: 1–5.
- Forattini, O. P. 1973. Entomologia médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmanioses, Bartonelose. Edgard Blücher Ltda., São Paulo.
- Galati, E. A. B. 2019. Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas. Vol II. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Killick-Kendrick, R., A. J. Leaney, and P. D. Ready. 1977. THE ESTABLISHMENT, MAINTENANCE AND PRODUCTIVITY OF A LABORATORY COLONY OF LUTZOMYIA LONGIPALPIS. J. Med. Entomol. 13: 429–440.
- Moya, S. L., E. A. Szelag, M. Manteca-Acosta, M. G. Quintana, and O. D. Salomón. 2022. Update of the Phlebotominae Fauna with New Records for Argentina and Observations on Leishmaniasis Transmission Scenarios at a Regional Scale. Neotrop. Entomol. 51: 311–323.
- Rangel, E. F., N. A. de Souza, E. D. Wermelinger, and A. F. Barbosa. 1985. Estabelecimento de colônia, em laboratório, de Lutzomyia intermedia Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 80: 219–226.
- Salomón, O. D., M. G. Quintana, and J. R. Rosa. 2008. Ecoepidemiología de la leishmaniasis cutánea en la Argentina. Salud(i)Ciencia. 16: 514–520.
- Santini, M. S., and O. D. Salomon. 2012. Eco-epidemiología de las leishmaniosis Argentina. Rev. Argentina Parasitol. 1: 16–24.
- Szelag, E. A., J. R. Rosa, M. G. Quintana, and O. D. Salomon. 2018. Temporal distribution of, and effect of anthropic modifications on, phlebotomine populations in the Chaco Bioregion, Argentina. Med. Vet. Entomol. 32: 206–215.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Alberto J. Roemmers por la financiación parcial de este proyecto.



Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers