
Anales

de la Fundación

Alberto J. Roemmers

Volumen XXV

Libro de edición Argentina

Es propiedad
Derechos reservados.
© 2014, por la Fundación
Alberto J. Roemmers.
Buenos Aires, Argentina.
Queda hecho el depósito
que marca la ley 11.723

Impreso en la Argentina
Printed in Argentina
Libro de distribución gratuita
Prohibida su venta

Editado e impreso por
Ediciones Médicas del Sur S.R.L.
Junín 917 2º D - C.A.B.A.
ediciones@prensamedica.com.ar

ÍNDICE

SUBSIDIOS 2010-2012

Introducción	13
ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DE BOCAVIRUS HUMANO ASOCIADO A INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA. M. P. Adamo; L. Ghietto; D. Majul; A. Cámara; J. Cámara	15
CARACTERIZACIÓN DE MONOCITOS CIRCULANTES Y DE LÍQUIDO PLEURAL DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR. POSIBLE VALOR PRONÓSTICO/DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD. M. Alemán	25
INFLUENCIA DE FACTORES FARMACOGENÉTICOS Y FARMACOCINÉTICOS EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON METOTREXATO (MTX) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON OSTEOSARCOMA (OS). H. V. Aráoz; W. Cacciavillano; P. Schaiquevic; A. Rose; P. Caceres Guido; N. R. V. Licciardone; S. Recalde; P. Zubizarreta; L. Chertkoff	34
DETERMINANTES MOLECULARES DEL GEN ENV DEL HIV-1 QUE IMPACTAN EN LA EVOLUCIÓN VIRAL ASOCIADA AL USO DIFERENCIAL DE LOS CO-RECEPTORES CCR5 Y CXCR4. P. Aulicino; M. F. Fernandez; A. Rossi; C. Crudeli; C. Rocco; A. Mangano; L. Sen	49
EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA TH17 SOBRE PACIENTE CON TUBERCULOSIS SENSIBLE Y TUBERCULOSIS MULTIRRESISTENTE A DROGAS. J. I. Basile	57

ANÁLISIS DE LOS GENES TNF-A E IFN- γ EN PACIENTES CON SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS Y ANEMIA APLÁSICA: PRESENCIA DE POLIMORFISMOS Y NIVELES DE EXPRESIÓN. C. Belli; C. Ferri; M. S. Gori; G. Salamone; Y. Bestach	68
ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA OBESIDAD Y EL ESTRÉS CRÓNICO EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA EN HUMANOS. G. A. Berg; H. Grosman; B. Fabre; M. López; E. Becher	82
INSULINO-RESISTENCIA E INFLAMACIÓN. FACTORES DE RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR. G. Bonneau; W. Pedrozo	84
INDICADORES DE INFLAMACIÓN Y ATROSCLEROSIS EN TRASTORNOS DEL METABOLISMO DEL HIERRO. F. D. Brites; J. Arbelbide; L. E. Boero; L. Gómez Rosso; T. Meroño	95
RELEVAMIENTO DEL CONTENIDO DE CALCIO EN LÁCTEOS DE USO MASIVO. CONSTRUCCIÓN DE UNA BASE DE DATOS DE ACCESO LIBRE. L. R. M. Brun; M. L. Brance; H. Moreno; D. Vicente	101
ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE INFECCIONES CAUSADAS POR LEVADURAS PERTENECIENTES AL GÉNERO CRYPTOCOCCUS MEDIANTE EL EMPLEO DE TÉCNICAS MOLECULARES. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS Y VARIEDADES DE AISLAMIENTOS AUTÓCTONOS. S. Carnovale; D. Anyelen	106
ESTUDIO DE ÁRBOLES AUTÓCTONOS COMO NICHOS ECOLÓGICOS DE ESPECIES PATÓGENAS DEL GÉNERO CRYPTOCOCCUS. M. E. Cattana; M. L. Mangiaterra; F. D. Rojas	111
DIAGNÓSTICO MOLECULAR RÁPIDO DEL COMPLEJO BURKHOLDERIA CEPACIA EN PACIENTES FIBROQUÍSTICOS. D. Centrón	120

PRESENCIA DE RICKETTSIAS, EHRLICHIAS Y ANAPLASMAS EN GARRAPATAS Y CANINOS DE BARRIOS CARECIENTES DE LA CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES Y DEL MUNICIPIO DE BAHÍA BLANCA. G. Cicuttin; D. Brambatti; J. Rodríguez; C. González Lebrero; P. Vidal; N. De Salvo; F. Beltrán; F. Gury Dohmen; I. Jado García; P. Anda	122
IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS EN LA POBLACIÓN INFANTIL CON FACTORES DE RIESGO DE ABUSO SEXUAL C. G. Cuffini; X. Kiguen; J. L. Kiguen; P. Montanaro; M. C. Frutos; F. Venezuela; C. E. Alonso	133
EPIDEMIOLOGÍA DE LA MALARIA EN EL NOROESTE DE ARGENTINA: DINÁMICA DE LA TRASMISIÓN. M. J. Dantur Juri; M. Zaidenberg; M. Abril; C. Veggiani Aybar; G. Galante; M. S. Olea; E. Laci; C. Laci; D. Carrizo; A. Alancay; J. Romero; V. González; A. De Lucio; P. Mula Lozano; P. Berzosa Díaz	145
PREVENCIÓN PRIMARIA DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES EN JÓVENES. E. M. Escudero; M. C. Villa-Abrille; M. Nolly; O. A. Pinilla; I. Ennis	158
DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MÓDULO RCCX Y DE GENES DE FUSIÓN CYP21A2-CYP21A1P EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA DE NUESTRA POBLACIÓN. C. S. Fernández, Cecilia Analía Panek, Marina S Palermo	161
PARTICIPACIÓN DE LA POBLACIÓN DE MONOCITOS EN EL DESARROLLO DE SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO. G. C. Fernández; C. A. Panek; M. S. Palermo	172
BIOTA FÚNGICA AMBIENTAL EN UNIDADES DE INTERNACIÓN CRÍTICAS PEDIÁTRICAS. M. S. Fernández; G. E. Giusiano	187

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ESPECIFICA EN EL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) Y DESARROLLO DE ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS.	196
R. J. Fernández-Brando; L. V. Bentancor; M. P. Mejías; G. Cabrera.	
CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS DIRIGIDOS AL FVIII EN HEMOFILIA A SEVERA. DETERMINACIÓN DE SU IMPORTANCIA EN EL MANEJO CLÍNICO DE LOS PACIENTES.	204
N. Galassi; M. B. Irigoyen; M. Felippo; M. Candela; L. Primiani; R. Pérez Bianco; M. M. de E. de Bracco	
FACTORES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN, SOBREVIDA, MIGRACIÓN Y METÁSTASIS DE LA CÉLULA TUMORAL MAMARIA HUMANA EN HUESO Y SU IMPORTANCIA PRONÓSTICO.	216
V. Labovsky; L. Martinez; M. L. Calcagno; K. M. Davies; A. Wernicke; H. Garcia-Rivello; V. B. Fernández-Vallone; N. A. Chasseing	
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES PARASITARIAS NATURALES IMPLICADAS EN LA MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA.	229
R. H. Lucero; D. O. Hernández; B. L. Brusés; L. B. Formichelli; C. Cura; A. G. Schijman	
DIAGNÓSTICO MOLECULAR TEMPRANO DE GENOTIPOS CARCINOGENICOS DE HELICOBACTER PYROLI EN MUESTRAS DE BIOPSIAS GÁSTRICAS EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA.	237
M. G. Medina; P. Motta; L. A. Merino; M. De Los A. López; N. Pegoraro; M. L. Medina	
ESTUDIO DE LOS MECANISMOS PATOGENICOS EN ENDOMETRIOSIS COMO BASES PARA HALLAR NUEVOS ABORDAJES TERAPÉUTICOS.	251
G. Meresman; C. Olivares; J. I. Bastón	
FOLICULOGENESIS Y POLIQUISTOSIS OVÁRICA. ROL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES ACTIVADOS POR LOS PEROXISOMAS GAMA (PPAR GAMA).	263
A. B. Motta	

EPIDEMIOLOGIA DE RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS Y SU RELACIÓN CON MYCOPLASMA, UREAPLASMA Y CLAMIDIA TRACHOMATIS. S. Natale; M. Sabaris; Y. Rode; L. Accarezzato	269
APORTES PARA LA OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DE LA INFECCIÓN POR HIV EN GRUPOS MAYORMENTE AFECTADOS POR LA EPIDEMIA: PRUEBA PILOTO PARA FUTURO ESTUDIO DE INTERVENCIÓN COMUNITARIA. M. de los A. Pando; M. M. Avila; M. Gomez Carrillo; H. Salomón.	281
EVALUACIÓN DE FACTORES PRONÓSTICO ADICIONALES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA. M. J. Rico; V. R. Rozados; C. M. Alasino; O. G. Scharovsky; C. Herrera	287
EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE FLÚOR EN AGUAS DE CONSUMO DE LA PROVINCIA DE SANTA FE. RELACIÓN CON LA SALUD DENTAL Y EL RIESGO DE FLUOROSIS. A. Rigalli; M. Lupo; H. S. Moreno; C. Aguirre; M. Armendariz	297
ESTUDIO DEL PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE LEVADURAS DEL GÉNERO MALASSEZIA ASOCIADAS A AFECCIONES DÉRMICAS E INFECCIONES SISTÉMICAS. F. D. Rojas; G. E. Giusiano	306
ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN NIÑOS CON TALLA BAJA IDIOPÁTICA. M. G. Ropelato	313
ECOEPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA Y VISCERAL EN UNA COMUNIDAD DE POBLADORES ORIGINARIOS DE "EL IMPENETRABLE" (TRES ISLETAS, CHACO) EN COORDINACIÓN CON EL SISTEMA DE SALUD LOCAL. J. R. Rosa; M. Parras; A. Szelag; O. D. Salomon	318

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR DE LA HIDATIDOSIS EN MISIONES, ARGENTINA. M. C. Rosenzvit; K. Vizcaychipi; N. Macchiaroli; M. A. Cucher; L. Prada; M. Martínez; L. Kamenetzky; F. Camicia; G. Carballo; A. D'Alessandro	328
INTERACCIÓN ENTRE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RUNX1 Y FOXP3: POTENCIAL MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ONCOGENES EN GLÁNDULA MAMARIA NORMAL Y TUMORAL. N. Rubinstein	344
EVALUACIÓN DE LA LECTINA LIGADORA DE MANOSA (MBL) EN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES INTERNADOS CON CONFIRMACIÓN DE INFECCIÓN POR INFLUENZA A (H1/N1) 2009. S. Ruvinsky; J. Gurevich; A. Monaco; G. Perez; L. Sen; R. Bologna; A. Mangano	356
PREVALENCIA DE ENFERMEDAD DE CHAGAS EN CANINOS EN ZONAS DE ALTA ENDEMICIDAD DE LA PROVINCIA DE SALTA. O. Sánchez Negrette; J. Binda; G. Trova; M. Alonso; R. Pereyra	370
EVALUACIÓN DE CITOQUINAS, ENZIMAS Y ANTICUERPOS COMO BIOMARCADORES ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PLEURESÍAS INFECCIOSAS Y MALIGNAS. L. P. Schierloh; R. M. Musella; E. Colman; G. C. De Casado	380
ESTUDIO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA COMO MEDIADOR DE LA RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON HERCEPTIN Y SU APLICACIÓN EN NUEVAS ESTRATEGIAS PRONÓSTICAS. R. Schillaci; M. Rivas; F. Mercogliano; M. Tkach; I. Frahm; E. Maronna	399
ESTUDIOS CITOGÉNÉTICOS Y MOLECULARES EN MIELOMA MÚLTIPLE. SU SIGNIFICADO CLÍNICO. I. Slavutsky; J. Panero; F. Stella	409

DETENCIÓN DE DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD EN CEPAS 412
DE "ENTEROCOCCUS SPP." RECUPERADAS DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL.

M. D. Sparo; M. M De Luca; C. M. Schell

ECOEPIDEMIOLOGÍA DE FLAVIVIRUS, MONITOREO DE SUS 421
VECTORES (DIPTERA: CULICIDAE) Y RESERVORIOS EN PAMPA
DEL INDIO. PROVINCIA DE CHACO, ARGENTINA.

M. Stein; G. I. Oria; L. A. Diaz; L. Spinsanti; M. Kowalevski; D. Huenten;
B. Pisano; M. Beranek; L. Aguirre; G. Zunino; O. S. Stechina; G. Deluca;
M. Contigiani; W. R. Almirón

BUSQUEDA DE HISTOPLASMA CAPSULATUM EN POBLACIONES 428
DE ROEDORES Y MURCIÉLAGOS EN LA CIUDAD DE BUENOS
AIRES.

O. V. Suárez; C. E. Canteros; R. O. Suárez-Alvarez; A. Toranzo;
M. Agra; H. D. Salas

DINÁMICA DE FLEBOTOMINOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE: 437
PHLEBOTOMINAE) PONTENCIALES VECTORES DE
LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA Y VISCERAL EN EL CHACO
HÚMEDO, PRIVINCIA DE CHACO, ARGENTINA.

E. A. Szelag; O. D. Salomon; J. R. Rosa

GENOTIPOS DE VKORC-1 Y SENSIBILIDAD A LOS 447
ANTICOAGULANTES ORALES. APORTE DE LAS
DETERMINACIONES GENÉTICAS PARA EL MANEJO PRÁCTICO
Y LA PREVENCIÓN DE EVENTOS.

M. P. Vera Morandini; A. N. Blanco; S. H. Grosso; S. S. Meschengieser





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

Vice-Presidente
Dr. Manuel Luis Martí

Secretario
Dr. Julio A. Bellomo

Vocales
Sr. Eduardo A. Macchiavello
Sr. Alberto Roemmers
Sr. Alejandro Guillermo Roemmers
Sr. Alfredo Pablo Roemmers
Dr. Miguel de Tezanos Pinto

Fiscalizadores
Dr. Eduardo L. Billinghamurst
Dr. Carlos Montero

INTRODUCCIÓN

En este volumen se publican los subsidios del Período 2010–2012, 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 mas de treinta 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



ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE BOCAVIRUS HUMANO ASOCIADO A INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA

M. P. Adamo; L. Ghietto; D. Majul; A. Cámara; J. Cámara

INFORME FINAL: SÍNTESIS

El Bocavirus Humano (HBoV) fue descubierto en 2005 a partir de aspirados nasofaríngeos de pacientes pediátricos con bronquiolitis o neumonía (Allander et al 2005. PMID: 16118271). Con el objetivo de aportar datos epidemiológicos locales para un mayor conocimiento de la circulación de HBoV en nuestro medio y contribuir a dilucidar el potencial patogénico del virus, en este trabajo, 1) se estimó la prevalencia de HBoV en pacientes con IRA y en individuos sin signos o síntomas respiratorios; 2) se describen características epidemiológicas y clínicas de los casos positivos (HBoV+); 3) caracterizar molecularmente las cepas circulantes.

METODOLOGÍA

El proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en la Investigación en Salud del Hospital Nacional de Clínicas, UNC, y del Comité de Ética del Polo Hospitalario del Niño y del Adulto, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba. La participación fue voluntaria y anónima, previa firma del consentimiento/asentimiento informado del participante, padres o tutor según correspondiera.

Se trabajó con muestras respiratorias de pacientes con IRA e individuos sin signos o síntomas de IRA. A lo largo de 2 períodos anuales completos se recolectaron al menos 120 muestras por año, incluyendo todos los grupos etarios. El grupo de individuos sin IRA (control) incluyó al menos 120 muestras de individuos sin enfermedad respiratoria al momento de la toma de la muestra ni durante las 2 semanas previas, distribuidas por grupos etarios y estación anual. Los participantes del grupo de individuos con IRA fueron

pacientes del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba y de distintos centros centinelas que participan del Programa de Vigilancia Viroológica de Influenza y otros Virus Respiratorios de la Provincia de Córdoba (que derivan muestras respiratorias al Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza para la OMS del Instituto de Virología-UNC de Córdoba).

Las muestras clínicas fueron aspirados o hisopados nasofaríngeos (ANF / HNF) homogenizados con 1 ml de PBS; las del grupo de pacientes con IRA se procesaron además según normas estándares para un panel diagnóstico de virus respiratorios -Influenza (FLU), Parainfluenza (PIV), Virus Respiratorio Sincicial (VRS), Adenovirus (AV), Metapneumovirus (MPV)- por inmunofluorescencia directa y para gérmenes comunes por hemocultivo.

Los ácidos nucleicos se extrajeron con buffer de guanidina y sílica a partir de 100 µl de HNF o 50 µl de ANF. La PCR se realizó con primers para NP1; los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8,5-10% teñido con nitrato de plata (Ghietto et al 2012. PMID: 22358354).

Se determinó carga viral relativa mediante PCR en tiempo real (qPCR) con SyberGreen y primers para un fragmento de NP1 (nt 2480-2558) en muestras respiratorias de 11 individuos del grupo control y 24 pacientes con IRA por triplicado. Para cada muestra se calculó el *fold change* respecto al grupo control mediante el modelo 2^{-ddCt} .

Para la genotipificación se amplificó el gen NP1 (nt 2321-3056) por nested-PCR. La secuenciación se realizó bidireccionalmente (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer - BigDye Terminator v. 3.1, Applied Biosystems). Las secuencias fueron editadas y analizadas mediante ALIGN Query, Clustal W2 y MEGA 5.03, incluyendo 26 aislamientos locales, secuencias de las 4 especies de HBoV y otros representantes del género Bocavirus disponibles en GenBank (números de acceso en Figura 4), mediante el método *Neighbor Joining* (matrices de distancia genética según modelo Kimura-2 parámetros, bootstrap para 1000 replicaciones).

Se determinó prevalencia por grupos etarios, estacionalidad, signos y síntomas asociados a la infección y a la carga viral relativa (baja: *fold change* de 0-9,9; media: *fold change* de 10-99,9; alta: *fold change* ≥ 100) los datos clínico-epidemiológicos de los pacientes HBoV+. Se describen los resultados por medio de porcentajes o media $\pm$ DS; para las comparaciones se usó test χ^2 , Fisher o Student ($p \leq 0.05$ para diferencias significativas).

RESULTADOS

La prevalencia general de HBoV en 1029 muestras analizadas de pacientes con IRA en el período 2010 – 2012 fue de 11,4% (117 muestras resultaron positivas). Las prevalencias anuales de HBoV fueron 39/219 (17,8%) en 2010, 24/379 (6,3%) en 2011 y 54/431 (12,5%) en 2012. Las prevalencias por grupos etarios y la estacionalidad (distribución anual por semana epidemiológica) se muestran en las figuras 1 y 2.

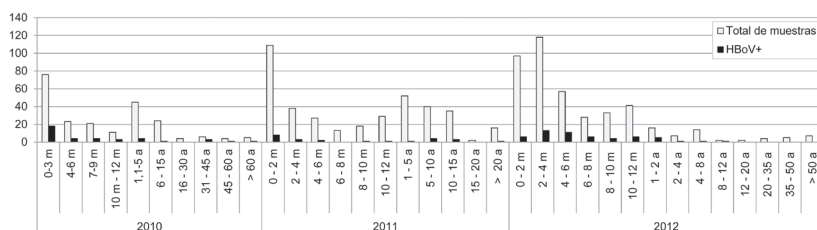


Figura 1. Distribución de muestras analizadas y positivas (HBoV+) por rango de edades; m: meses, a: años.

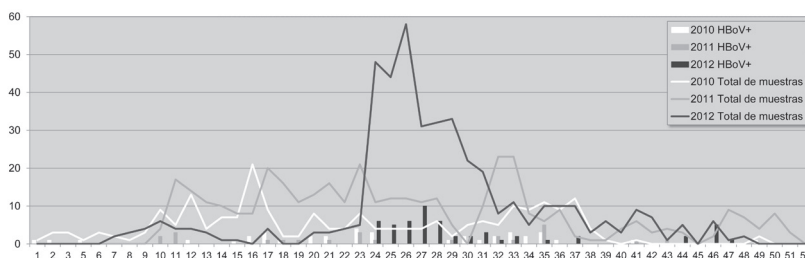


Figura 2. Distribución de muestras analizadas y muestras HBoV+ por semana epidemiológica y año de estudio.

Las frecuencias de coinfección fueron las siguientes: 35% en 2010 (83% con VRS, el resto con FLU), 50% en 2011 (41,7% con RSV, 25% con PIV, 25% con FLU y 8,3% con *Bordetella pertussis* –hemocultivo y PCR), y 35,2% en 2012 (94,4% con VRS, 5,6% con FLU y una muestra con hemocultivo posi-

tivo). La ubicación conjunta de detección de estos agentes por semana epidemiológica y edad de los pacientes (datos no mostrados) evidencia la cocirculación durante el período invernal y en lactantes principalmente (si bien la circulación del bocavirus puede extenderse todo el año y a niños escolares, adolescentes y adultos), lo cual puede ser determinante en las altas tasas de coinfección detectadas con VRS.

En el grupo de participantes asintomáticos se incluyeron 257 individuos, de los cuales 11 (4,3%) resultaron positivos. Todos estos casos ocurrieron en niños pre-adolescentes (de 9 a 12 años, Figura 3), en primavera; se trató de un brote escolar entre alumnos de distinto grado de una misma escuela.

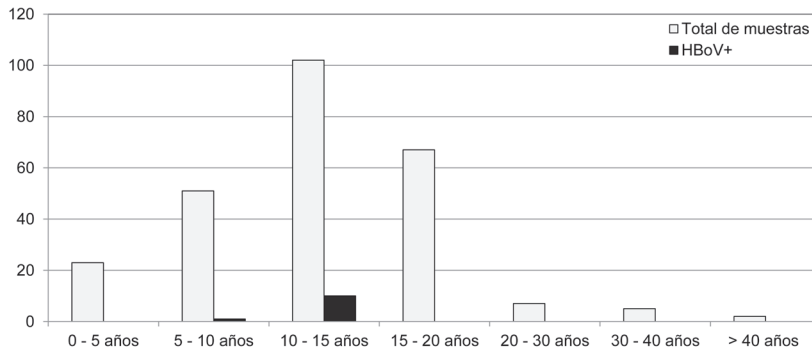


Figura 3. Distribución de muestras analizadas y casos HBoV+ por rango de edades entre individuos asintomáticos.

Los casos HBoV+ en el grupo de asintomáticos (quienes no registraban signos o síntomas respiratorios al momento de la toma de muestra ni en las 2 semanas previas) tuvieron en general carga viral baja (6/8, 75%). Por otro lado, los pacientes con IRA que resultaron HBoV+ tuvieron en general carga viral media o alta (12/19, 63,2%) (Tabla 1).

No se observó estacionalidad en la carga viral relativa ni relación entre esta y el sexo del individuo infectado. Sin embargo, se identificó un patrón de asociación entre carga viral relativa y codetección con otros virus respiratorios. Entre las 9/19 (47,4%) muestras cuantificadas de pacientes con IRA sin coinfección hubo igual proporción de muestras con carga viral baja y alta; en

cambio, entre las 10/19 (52,6%) muestras cuantificadas de pacientes con IRA en los que se detectó coinfección con otros virus, 6/10 (60%) tuvieron carga viral alta y 3/10 (30%) tuvieron carga viral baja (Tabla 1).

Tabla 1. Cuantificación viral relativa en 27 muestras HBoV+, 8 de individuos asintomáticos y 19 de pacientes con IRA (infecciones simples por HBoV y coinfecciones con otros virus respiratorios).

Condición clínica	Código de muestra	Tipo de muestra	Sexo	Edad (años)	Coinfección	Agente codetectado	Ct promedio	Ct prom normalizado	Ct prom normalizado ¹	Carga viral relativa
Asintomático	109	HNF	M	12	nd	-	35,2	1,3	0,8	Baja
Asintomático	193	HNF	M	12	nd	-	27,4	1,0	1,0	Baja
Asintomático	107	HNF	F	11	nd	-	27,1	1,0	1,0	Baja
Asintomático	92	HNF	M	11	nd	-	26,7	1,0	1,0	Baja
Asintomático	103	HNF	M	12	nd	-	25,9	1,0	1,0	Baja
Asintomático	112	HNF	M	9	nd	-	25,9	1,0	1,0	Baja
Asintomático	91	HNF	M	11	nd	-	23,2	0,9	1,1	Media
Asintomático	94	HNF	M	12	nd	-	21,7	0,8	1,2	Media
Sintomático	2600	ANF	F	0,083	No	-	37,5	1,4	0,7	Baja
Sintomático	2523	ANF	F	11	No	-	29,1	1,1	0,9	Baja
Sintomático	2911	HNF	M	23	No	-	29,0	1,1	0,9	Baja
Sintomático	2910	ANF	F	0,083	No	-	25,5	1,0	1,0	Baja
Sintomático	2771	HNF	M	6	No	-	22,7	0,9	1,2	Media
Sintomático	2912	ANF	F	1	No	-	15,8	0,6	1,7	Alta
Sintomático	2526	HNF	F	9	No	-	12,0	0,5	2,2	Alta
Sintomático	2914	ANF	F	0,17	No	-	11,5	0,4	2,3	Alta
Sintomático	2913	ANF	M	0,42	No	-	11,4	0,4	2,3	Alta
Sintomático	2848	HNF	M	14	Sí	FLU	39,3	1,5	0,7	Baja
Sintomático	2836	HNF	M	11	Sí	FLU	35,4	1,3	0,8	Baja
Sintomático	2835	HNF	M	10	Sí	PIV	29,1	1,1	0,9	Baja
Sintomático	2664	ANF	F	0,25	Sí	RSV	21,6	0,8	1,2	Media
Sintomático	2641	ANF	M	0,75	Sí	FLU	17,2	0,6	1,5	Alta
Sintomático	2696	ANF	M	0,083	Sí	RSV	16,4	0,6	1,6	Alta
Sintomático	2694	ANF	M	0,17	Sí	RSV	12,8	0,5	2,1	Alta
Sintomático	2995	ANF	M	0,42	Sí	PIV	12,7	0,5	2,1	Alta
Sintomático	3031	ANF	M	4	Sí	PIV	11,9	0,4	2,2	Alta
Sintomático	2633	ANF	M	0,33	Sí	RSV	11,7	0,4	2,3	Alta

nd: no determinado. Carga viral relativa **baja:** Ct promedio >25 y Ct promedio normalizado⁻¹ <1; **media:** Ct promedio entre 20 y 25 y Ct promedio normalizado⁻¹ entre 1 y 1,5; **alta:** Ct promedio <20 y Ct promedio normalizado⁻¹ ≥1,5.

Características clínico-epidemiológicas de la infección por HBoV

Se analizaron los datos de las historias clínicas de 38 pacientes HBoV+

sin coinfección evidente. Estos casos se presentaron en un rango amplio de semanas epidemiológicas (10 a la 49), abarcando fines de verano a primavera. El rango de edades fue de 1 mes a 11 años (edad promedio 1 año y 10 meses, mediana 7 meses, modo 1 mes). Se constató lactancia materna en 18/38 (47%) pacientes, contacto con persona con IRA en 2/38 (5%), riesgo de IRAB grave en 20/30 (53%), bajo peso en 11/38 (29%), hábitat con factores de contaminación ambiental en 12/38 (32%), hacinamiento en 2/38 (5%), hábitat rural en 2/38 (5%), vacunación completa para la edad en 28/38 (74%), antecedentes familiares de asma en 4/38 (11%) y atopía en 4/38 (11%) pacientes. Ninguno de los menores de 5 años asistía a guardería. Con respecto al laboratorio clínico, signos y síntomas, 30/38 (79%) de los pacientes HBoV+ presentó leucocitosis (recuento >10.000), 25/38 (66%) VSG elevada, 30/38 (79%) tos, 30/38 (79%) sibilancias, 20/38 (53%) fiebre (temperatura corporal $>37,5^{\circ}\text{C}$, $38,5\pm 0,6^{\circ}\text{C}$ en promedio), 14/38 (37%) rinitis, 7/38 (18%) emesis, 3/38 (8%) apnea, 3/38 (8%) diarrea, y 2/38 (5%) cianosis. El período

Tabla 2. Diferencias entre pacientes HBoV+ con carga viral relativa media / baja o alta.

Características clínico-epidemiológicas de pacientes HBoV+	Carga viral media / baja	Carga viral alta
Valor <i>fold change</i> de determinación de DNA en la muestra en comparación con el grupo control (asintomáticos)	4,5	8900
Sexo masculino	55,60%	70%
Edad (años)	8,4	1,6*
Desnutrición	ninguno	10% (un paciente)
Contaminación ambiental	33%	30%
Hábitat rural	0%	20%
Hacinamiento	0%	0%
Factores de riesgo de IRA grave	44%	70%*
Antecedentes de atopía	44%	10%
Diagnóstico de asma	56%	20%
Contacto con persona con IRA	11%	0%
Coinfección con RSV	11%	30%
Coinfección con FLU	22%	10%
Período prodromico (días)	2,5	2,8
Días de hospitalización	4	7,1*
Glóbulos blancos (recuento)	normal	leucocitosis*
VSG	22,2	29,3
ATB	44%	60%
Corticoide	78%	80%
Requerimiento de O2 (días)	2,8	6,2*
Fiebre	33%	40%
Tos	90%	100%
Radiografía de tórax	la mayoría normales o con infiltrado lado derecho	la mayoría con infiltrado bilateral*

* características con diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

prodrómico fue en promedio de $3,7 \pm 3,0$ días; 95% de los pacientes fueron hospitalizados (2 pacientes fueron ambulatorios, el resto requirió internación en sala de cuidados intermedios $6,8 \pm 4,8$ días). De este grupo de 38 pacientes, veintiocho (74%) requirieron terapia de O_2 ($4,5 \pm 3,3$ días en promedio), 28/38 (74%) recibió tratamiento con antibióticos y 6 (16%) tuvieron mala evolución (internación en UTI / UCI). Para 11/38 pacientes (29%) se trató del primer episodio de hospitalización. De los 38 pacientes analizados, 14 (37%) tuvieron IRA alta y 25 (66%) IRA baja diagnosticada en función de la radiografía de tórax. El patrón más frecuentemente observado fue infiltrado intersticial bilateral (12/25, 48%), seguido de infiltrados alveolares o intersticio-alveolares (bilaterales o predominio derecho), atrapamiento aéreo, atelectasias.

En la tabla 2 se muestran las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con IRA según la carga viral relativa de HBoV. En general, los pacientes HBoV+ con carga viral alta son menores de 2 años, tienen factores de riesgo de IRA baja grave (70%), presentan leucocitosis, permanecen hospitalizados por más tiempo, tienen más días de requerimiento de terapia de O_2 y la mayoría presenta infiltrado bilateral en la radiografía de tórax.

Genotipificación

Se secuenció el gen NP1 completo de 26 aislamientos locales de HBoV (nucleótidos 2321 a 3056 del genoma con número de acceso en GenBank DQ000496). Todos agruparon en el cluster de HBoV1 (Figura 4). Se observaron pocas mutaciones puntuales (sustituciones sin cambios aminoácidos) contribuyendo a una distancia genética general de 0,001, elevada homología y alta estabilidad genética en la región analizada, tanto entre las cepas locales como en comparación con la secuencia original de HBoV (DQ000496) y con otros aislamientos de HBoV1 alrededor del mundo.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados muestran que HBoV1 es un virus respiratorio frecuente particularmente entre niños con IRA menores de 2 años (Figura 1). Independientemente de las relativamente altas tasas de coinfección (que son comunes entre distintos agentes respiratorios), tanto la prevalencia baja en asintomáticos (Figura 3) como la carga viral baja en este grupo (Tabla 1), en comparación con una mayor prevalencia en individuos con enfermedad respiratoria (fluctuante según el año, Figura 2), entre los que en general la carga

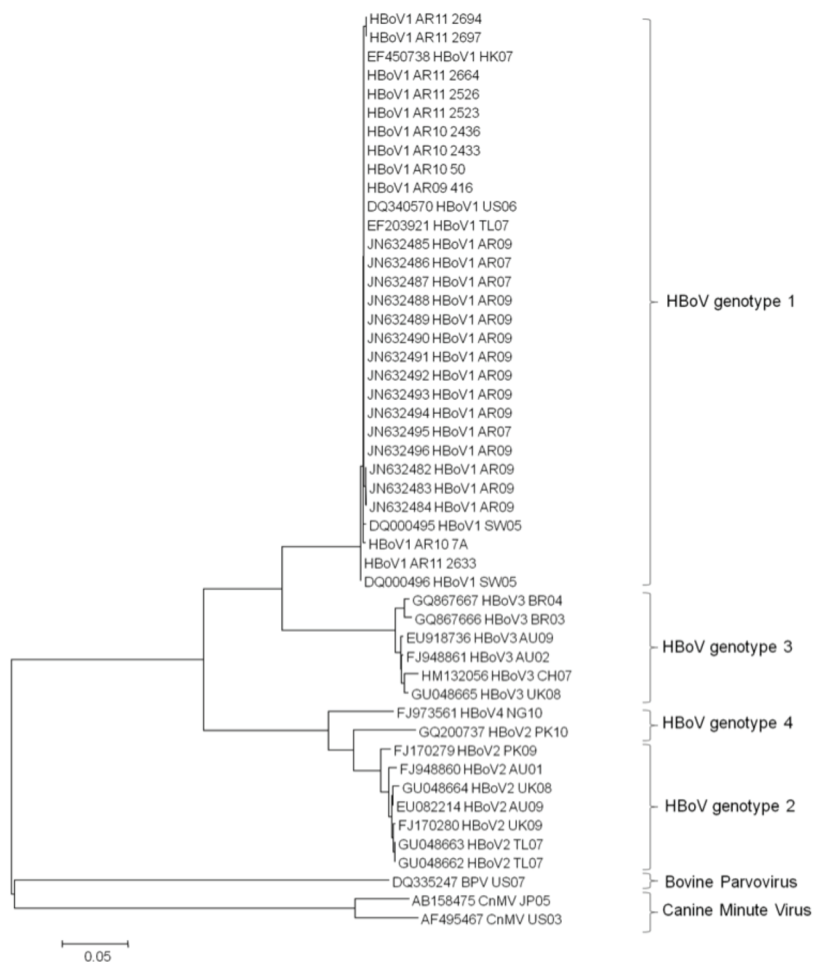


Figura 4. Filograma con 26 aislamientos locales de HBovV (la denominación incluye “AR” en referencia a Argentina y los dos últimos dígitos correspondientes al año de aislamiento), todos agrupados en el clado de HBovV1.

viral relativa es media o alta (Tabla 1), indican una relación causal entre el virus y la patología respiratoria. En este trabajo las principales manifestaciones clínicas asociadas a la infección por HBoV fueron leucocitosis, VSG elevada, tos, sibilancias y fiebre. Menos comunes fueron rinitis, vómitos, apnea, diarrea y cianosis. En términos generales se puede sintetizar que la enfermedad se presentó con aproximadamente 4 días de pródromo y requirió en promedio 7 días de internación en sala de cuidados intermedios. La mayoría de los pacientes hospitalizados fueron menores de 2 años y requieren oxigenoterapia; la evolución fue buena. La infección se asoció tanto con IRA alta como baja, aunque la mayoría presentó IRA baja, siendo el infiltrado intersticial bilateral el patrón pulmonar más frecuentemente observado en la radiografía de tórax. Estas manifestaciones clínicas se presentan en pacientes con carga viral alta, siendo más leves o moderadas en pacientes con carga viral media o baja (Tabla 2). Un estudio reciente ha demostrado una correlación entre primoinfección y enfermedad de la vía respiratoria alta y baja en niños menores de 2 años (Meriluoto et al 2012. PMID: 22305021), sugiriéndose también la ocurrencia frecuente de reinfecciones no asociadas a manifestaciones clínicas en niños escolares. Nuestros datos sobre detección del virus en muestras respiratorias de niños en edad escolar asintomáticos suman evidencia en ese sentido (Figura 3). Finalmente, a semejanza de otros trabajos publicados durante el desarrollo de este proyecto, HBoV1 fue la única especie del género detectada, por lo cual actualmente se considera al HBoV1 como el único bocavirus humano respiratorio.

ABSTRACT

In order to provide local epidemiological data for a better understanding of the circulation of Human Bocavirus 1 (HBoV1) in Córdoba, Argentina, and to contribute to elucidate the pathogenic potential of the virus in acute respiratory infection (ARI), we analyzed epidemiological and clinical aspects of HBoV1 in patients with ARI and in asymptomatic individuals from Jan. 2010 through Dec. 2012. The project was approved by Ethics Committees of *Hospital Nacional de Clínicas*, *Universidad Nacional de Córdoba*, and *Polo Hospitalario del Niño y el Adulto*, Córdoba. Of 1029 respiratory samples from patients with ARI, 117 (11.4%) were positive: 39/219 (17.8%) in 2010, 24/379 (6.3%) in 2011 and 54/431 (12.5%) in 2012. The prevalence in infants <1 year old was 74.4%, 62.5% and 85.2%, respectively; 74.4% of all cases occurred in late fall through early spring. Coinfection rates were 35% in 2010 (83%

with RSV), 50% in 2011 (41.7% with RSV) and 35.2% in 2012 (94.4% with RSV). Among 257 asymptomatic individuals, 11 (4.3%) were positive; all of them were 9–12 years old, 75% had low viral load. On the other hand, 63.2% HBoV+ symptomatic individuals had medium or high viral load, and in 60% patients with high viral load HBoV1 was codetected with another respiratory virus. Major signs/symptoms associated with monoinfection were: leukocytosis, elevated ESR, cough, wheezing, and fever. The prodromal period was 3.7 ± 3.0 days; 95% patients were hospitalized (6.8 ± 4.8 days) and 74% required oxygen therapy (4.5 ± 3.3 days). Lower ARI was diagnosed in 66% patients based on chest x-ray (bilateral interstitial infiltrate was the most frequent pattern). The majority of the patients with high viral load was <2 years old and remained hospitalized longer. The results show that HBoV1 is a common respiratory virus in infants with ARI. The low prevalence and low viral load in asymptomatic individuals compared to patients with ARI suggest a causal relationship between the virus and respiratory disease. The detection of the virus in asymptomatic preadolescent children adds evidence that supports the hypothesis of frequent occurrence of asymptomatic re-infection among school-age children.

CARACTERIZACIÓN DE MONOCITOS CIRCULANTES Y DE LÍQUIDO PLEURAL DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR. POSIBLE VALOR PRONÓSTICO/DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD.

Mercedes Alemán
IMEX- Academia Nacional de Medicina

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica cuyo agente infeccioso es el *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), un bacilo intracelular obligatorio que ingresa en su huésped por vía aérea a través de gotas que contienen al bacilo siendo diseminadas en el pulmón, donde genera una respuesta inflamatoria exudativa con influjo de neutrófilos, linfocitos y Mo por efecto de factores quimiotácticos presentes en el foco infeccioso. La Organización Mundial de la Salud calcula que aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada con *Mtb* causando 3 millones de muertes por año en todo el mundo. En Argentina más de 12.000 personas se enferman anualmente de TB, y alrededor de 900 personas mueren por año a causa de esta enfermedad. Para su control es fundamental el rápido diagnóstico y tratamiento. El diagnóstico por baciloscopía de esputo, tiene una efectividad del 50-60%, y los cultivos micobacterianos requieren de 6 a 8 semanas para ser interpretados.

Los monocitos (Mo) son componentes centrales en la inflamación e inmunidad y median funciones importantes tales como la fagocitosis, la presentación antigénica, la producción de citoquinas, además, abastecen de precursores de macrófagos y células dendríticas a los tejidos periféricos y contribuyen directamente con la defensa inmune contra patógenos microbianos en el sitio de infección. En humanos, los Mo circulantes pueden dividirse en dos sub-poblaciones de acuerdo a la expresión de CD14, un componente del receptor del lipopolisacárido, y de CD16, el receptor para inmunoglobulinas de tipo FcγRIII. Los Mo con alta expresión de CD14 y negativos para CD16 (CD16-) representan entre el 80-90% de los Mo circulantes. Por el contrario, los Mo con baja expresión de CD14 y positivos para CD16 (CD16+) constituyen cerca del 10% de los Mo circulantes en condiciones normales. Los Mo CD16+ aumentan durante las infecciones, producen altas cantidades de TNF- α y bajos niveles de IL-10 y por lo tanto se los denomina como Mo

pro-inflamatorios (Serbina NV, 2008). Esta población CD16+ se encuentra elevada en individuos con infecciones crónicas o recurrentes, se expande en infecciones agudas y se revierte con el uso de antibióticos o glucocorticoides. Se ha descrito que el número de Mo CD16+ correlacionan con la carga viral en pacientes con VIH (Fischer-Smith T, 2008).

Dado que no se conoce aún el rol de esta población de Mo en la fisiopatología de la tuberculosis (TB), nos propusimos identificar los mecanismos que suscitan el incremento de la población de monocitos CD16+ en periferia y líquido pleural de pacientes con TB y establecer una posible correlación con parámetros clínicos de los pacientes que permita determinar la existencia de una asociación entre el fenotipo de la población de Mo circulantes y un valor pronóstico/diagnóstico de la TB.

RESULTADOS

En primer lugar se evaluó por citometría de flujo el fenotipo de los Mo de sangre periférica (SP) de pacientes con TB y dadores sanos (DS) con respecto a aquellos marcadores que son relevantes en la respuesta frente a TB. Las características clínicas de los pacientes con TB (con y sin derrame pleural) y de dadores sanos (DS) se resumen en la **Tabla 1**.

No se encontraron diferencias significativas para la edad y el sexo como tampoco en el recuento leucocitario. Sin embargo, la distribución de la población CD16+ fue significativamente mayor en los TB así como la expresión de CD14, CD16, CD11b, entre DS y TB y entre las sub-poblaciones de Mo (CD16+ y CD16-) (**Figura 1 A-B** y **Tabla 2**). Ya que el recuento de leucocitos no varía, podemos pensar que no habría un incremento selectivo de la población CD16+ en los TB, sino en la proporción del mismo respecto del subset CD16-.

Considerando que la sub-población CD14+/CD16+ exhibe una expresión elevada de CD11b, y este es un importante receptor de entrada para *Mtb* en el Mo, esto podría impactar en su capacidad de unión (y fagocitosis) del *Mtb*. Tal como se observa en la **Figura 1 C**, tanto la unión como la fagocitosis del *Mtb* (determinando por citometría de flujo la unión de *Mtb* conjugado a FITC, *Mtb*-FITC), fue significativamente mayor en los Mo CD16+ (sin diferencias entre TB y DS para el mismo subset, datos no mostrados), por lo que los TB exhibirían una mayor proporción de la población mas eficiente en la función fagocítica.

Tabla 1: TB pulmonar, TB plaurisy, patients with TB pleurisy. aAFB in sputum or culture: 1+, 2+, 3+ AFB fue definida en base a la escala de cuantificación de la Inición Internacional contra la tuberculosis y enfermedades pulmonares (the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, IUARLD) y de World Health Organization (WHO).

Características clínicas de las poblaciones estudiadas

Datos		diagnóstico		
		Dadores sanos	TB no pleural	TB pleural
Datos generales	N	30	40	10
	edad	30 (20-45)	36 (23-50)	30 (20-55)
	género	15F/15M	10F/30M	2F/8M
	PPD+*, %	ND	25	ND
	días de evolución	-	41 (7-90)	ND
	AFB*, %	-	+, 33 ++, 30 +++, 33	ND
Sangre periférica	Recuento leucocitario, media± ES, cel/μL	8,200 ± 420	9,093 ± 318	7,400 ± 900
	Linfocitos (rango), %	32 ± 15	28 ± 8	21 ± 12
	Monocitos (rango), %	6 ± 3	8 ± 3	6 ± 3
Derrame pleural	Recuento de células (rango), cel/μL	-	-	2,300 (500-3000)
	Células mononucleares media ± ES (rango), %	-	-	71 ± 15

*AFB: acid-fast bacillus en esputo o cultivo; PPD: purified protein derivative skin test

El patrón de expresión normal de quimioquinas (CCR5 elevado en CD16+ y CCR2 en CD16-) (Ancuta, 2003) aparece alterado en Mo de TB ya que co-expresan CCR2 y CCR5 (**Figura 1 B**). Se sabe que durante procesos inflamatorios y ciertas infecciones el reclutamiento de Mo al tejido inflamado es mediado por CCR2 y CCR5 en respuesta a factores quimiotácticos tales como: MCPs, MIP-1α, MIP-1β, y/o RANTES (Boring L., 1997). Por lo tanto, en pacientes con TB, ambas sub-poblaciones de Mo son potencialmente capaces de migrar al pulmón en respuesta a RANTES y MIP-1α, ambos presentes durante la infección.

El contenido del espacio pleural es probablemente un fiel reflejo del proceso inflamatorio e inmunológico en curso, ya que las capas pleurales serosas son altamente permeables y están en íntimo contacto con el microambiente local. Por lo tanto, la pleuresía tuberculosa provee un buen modelo para el estudio de la respuesta inmune *in vivo* ya que la respuesta inmune frente a *Mtb* se compartimentaliza en el espacio pleural [Barnes PF, 1989]. Por esa

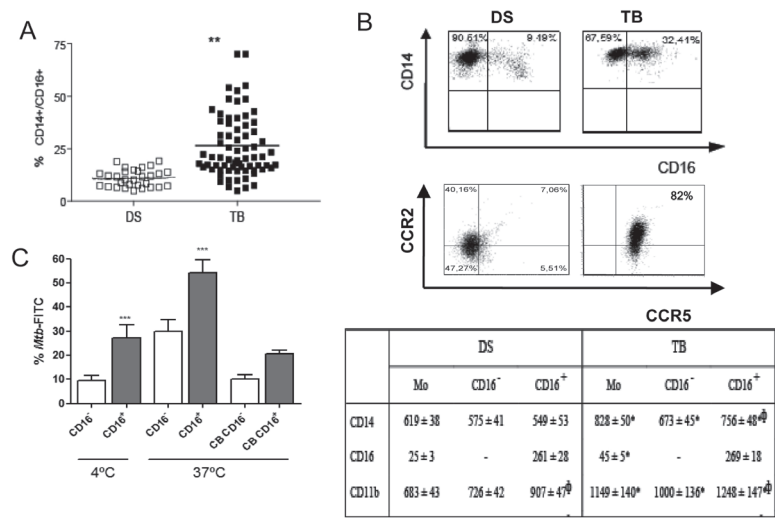
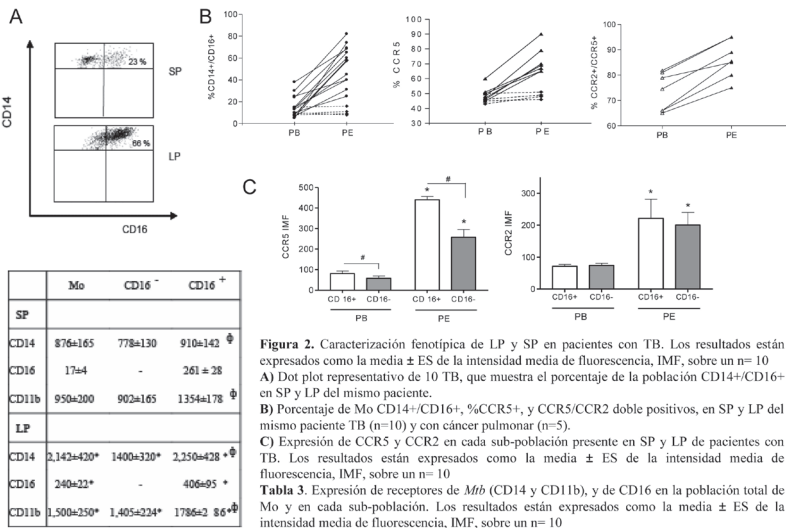


Figura 1.
A) Frecuencia de la distribución de la población CD14+/CD16+ en donadores sanos (DS) y pacientes con tuberculosis pulmonar activa (TB) ***p*<0.01
B) Dot plot representativos de la expresión de CD14+/CD16+ y CCR5/CCR2 que muestra la distribución de las diferentes sub-poblaciones de Mo en donadores sanos (DS) y en pacientes con tuberculosis (TB).
C) Fagocitosis diferencial expresado como % de Mo que expresan *Mtb*-FITC, unido/ingerido, sobre un *n*= 6. ****P*<0.01.

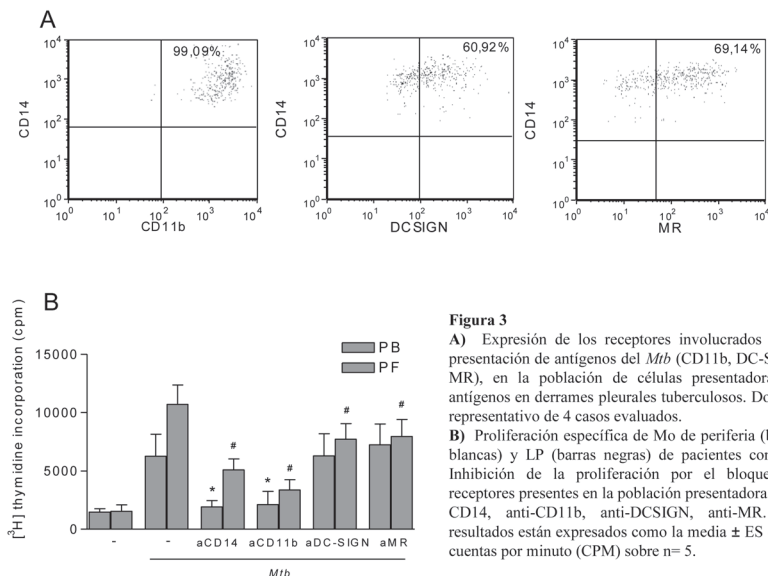
Tabla 2. Expresión de receptores de *Mtb* (CD14 y CD11b), y de CD16 en la población total de Mo y en cada sub-población. Los resultados están expresados como la media ± ES de la intensidad media de fluorescencia, IMF, sobre un *n*= 15. CD16+ versus CD16-: **p*<0.05; TB versus DS: **p*<0.05

razón, la población de Mo fue evaluada en los líquidos obtenidos de derrames pleurales (LP) de 10 pacientes con pleuresía tuberculosa y 5 pacientes con cáncer de pulmón. Se comparó el fenotipo de las células CD14+ con su correspondiente población en sangre periférica (SP) y se observó que, mas de un 80% de los Mo de LP son de fenotipo CD16+ (**Figura 2 A**) y una expresión de CD16, CCR5, CCR2, CD11b, y CD14 significativamente mayor que aquellos obtenidos de su misma SP con aporte de ambas sub-poblaciones aunque en mayor medida por los Mo CD16+ (**Tabla 3 y Figura 2 C**). Además, se vio significativamente aumentado en LP, el porcentaje de células doble positivas (CCR2/CCR5) (**Figura 2 B**). Por el contrario, LP provenientes de cáncer de pulmón, no exhibieron dicho fenotipo. Esto sugiere que es la misma infección y no un proceso inflamatorio inespecífico asociado, el que determina la generación de dicho patrón de expresión. El receptor de quimioquinas, CCR5 es también un receptor que media la activación durante la infección

tuberculosa, a través de la unión de la *hsp70* del *Mtb* (Whittall, T., 2006), por lo que su incremento en LP podría modularse por la interacción con antígenos del *Mtb* allí presentes.



A fin de caracterizar mas profundamente la población de Mo que migraron al sitio de infección se evaluó la expresión de aquellos receptores involucrados en el reconocimiento/procesamiento/presentación del *Mtb* tales como DC-SIGN y receptor de manosa (MR) (dos lectinas tipo-C, que reconocen eficientemente *Mtb* y participan en el procesamiento del mismo) y la integrina CD11b de múltiples funciones que también reconoce *Mtb* y media la entrada al Mo (como mencionamos anteriormente). Los resultados obtenidos muestran que, las células presentadoras de antígenos (APC) que se encuentran en el sitio de infección tuberculosa expresan CD11b, y son positivas para DC-SIGN+ en un 32,8% y para MR+ en un 40,7% (**Figura 3 A**). Dicho fenotipo, se vio reflejado en su capacidad de inducir la proliferación de linfocitos de memoria contra *Mtb* (ensayo de *recall* estimulando con el bacilo irradiado) ya que la respuesta linfoproliferativa fue inducida mas eficientemente por las CPA de LP que SP, y pudo ser inhibida mediante el bloqueo de los receptores antes mencionados (**Figura 3 B**).



En cuanto a la implicancia clínica de los fenotipos encontrados, cabe destacar que, el porcentaje de Mo CD16+ en SP, correlacionó con la extensión radiológica (cuanto mas severa se presenta la enfermedad, mayor porcentaje de Mo CD16+ tiene en circulación el paciente). Sin embargo esto no correlacionó con la evolución de los síntomas o la baciloscopía de esputo (**Figura 4 A**). Dado que la expresión de CD16 puede ser inducida por TGF- β , TNF- α , e IL-10 en Mo (Welch GR, 1990), fue medida su concentración en plasma de TB y DS y se encontró que la concentración plasmática de TNF- α (aunque no la de TGF- β o IL-10) correlacionaba positivamente con el porcentaje de CD16+ circulante mientras que el 86% de las muestras de DS no mostraron valores detectables de TNF- α (Spearman $r=0.52$; $p<0.04$) (**Figura 4 B**).

Como vimos anteriormente, los pacientes que presentan derrame pleural, tienen en el sitio de infección una población de Mo que es preponderantemente CD16+ y con efectiva respuesta específica frente a *Mtb*. Sin embargo, la población en periferia muestra un perfil cabalmente menos marcado que las formas mas severas de la enfermedad. Teniendo en cuenta que la pleuresía tuberculosa generalmente resuelve sin tratamiento dado que el paciente monta una respuesta relativamente eficiente contra *Mtb* (Barnes PF; 1989)

podríamos suponer que la población de Mo CD16+ juega un papel positivo contra la micobacteria en el sitio de infección, por lo que la los mecanismos que subyacen a la migración de la población monocítica al foco sumaría importancia clínica.

La correlación observada entre la concentración plasmática de TNF- α en TB y la extensión de Mo CD16+ en periferia sería el resultado de una mayor secreción de TNF- α por los Mo CD16+ (Belge, KU, 2002) y no una consecuencia del efecto del TNF- α sobre la expresión de CD16. Esto última posibilidad queda descartada dado que el suero de TB no indujo la expresión de CD16+, mientras que el sobrenadante libre de células de LP si tuvo efecto significativo (datos no mostrados).

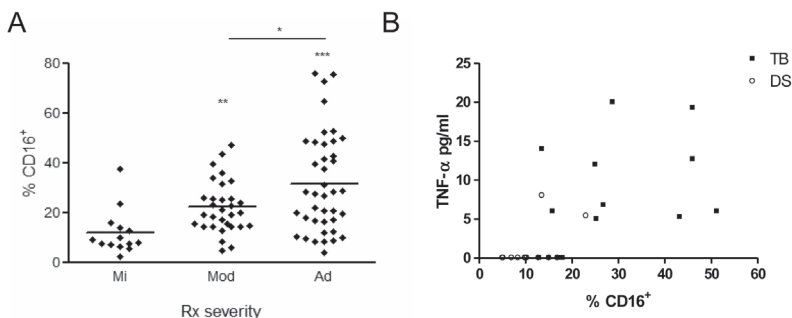


Figura 4

A) Distribución de la expresión de CD16 en Mo de pacientes con TB clasificados según la severidad en base a la radiografía de tórax. La clasificación de los grupos de pacientes fue mild o leve (Mi), moderada (Mod), y avanzada (Ad). ** $P < 0.01$ mi versus mod o mod versus ad; * $P < 0.01$: mi versus ad; *** $P < 0.001$, Kruskal-Wallis corregido por test de comparación múltiple de Dunn.

B) Correlación entre el % de Mo CD16+ y los niveles plasmáticos de TNF- α medido por ELISA. Spearman $r = 0.52$; * $P < 0.05$ ($n=15$).

CONCLUSIONES

La expansión de la población de Mo circulantes CD16+ en TB correlaciona positivamente con la severidad con la que se presenta la enfermedad y con la concentración plasmática de TNF- α , por lo que, en circulación se notaría un perfil inflamatorio en el Mo que revestiría relevancia clínica.

En el sitio de infección, la preponderancia de Mo CD16+ sería consecuencia: 1) de la migración diferencial desde circulación de dicho subset (favorecido por la expresión de CCR2/CCR5) y 2) de la adquisición (*up-regulación*) del receptor CD16, inducida por los mediadores solubles presentes en el foco inflamatorio tuberculoso.

En el sitio de infección de aquellos pacientes que presentaron pleuresía tuberculosa, los Mo CD16+ son abundantes y eficientes CPA, mientras que, su preponderancia en circulación estaría mas bien asociada a, severidad radiológica y altas concentraciones de TNF- α .

ABSTRACT

The aim of this work was to characterize monocyte (Mo) subsets from TB patients and to assess whether the inflammatory milieu from TB pleurisy modulate their phenotype and recruitment. We found an expansion of peripheral CD16+ Mo that correlated with disease severity and with TNF- α plasma levels. Circulating Mo from TB patients are activated, showing a higher CD14, CD16, and CD11b expression and *Mtb* binding than Mo from healthy subjects. Both subsets simultaneously expressed CCR2 and CCR5, showing a potential ability to migrate to the inflammatory site. In tuberculous pleural fluid (PF), the CD16+ subset was the main Mo population, accumulation that can be favored by the induction of CD16 expression in CD16- Mo triggered by soluble factors found in this inflammatory milieu. CD16+ Mo in PF were characterized by a high density of receptors for *Mtb* recognition (DC-SIGN, MR, CD11b), allowing them to induce a successful, specific T cell proliferation response. Hence, in tuberculous PF, CD16+ Mo constitute the main APC population, whereas in PB, their predominance is associated with the severity of pulmonary TB, suggesting a dual role of the CD16+ Mo subset that depends on the cellular localization.

REFERENCIAS

1. Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S. K., Luscinskas, F. W., Gabuzda, D. (2003) Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J. Exp. Med.* **197**, 1701–1707.
2. Balboa L, Romero M, Yokobori N, Schierloh P, Musella R, Abbate E, S de la Barra, Sasiain M, Alemán M. (2009). Tuberculosis: Biology, Pathology and Therapy. Keystone symposia.
3. Barnes, P. F., Mistry, S. D., Cooper, C. L., Pirmez, C., Rea, T. H., Modlin, R. L.

- (1989) Compartmentalization of a CD4+ T lymphocyte subpopulation in tuberculous pleuritis. *J. Immunol.* **142**, 1114–1119.
4. Belge, K. U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., Ziegler-Heitbrock, L. (2002) The proinflammatory CD14+CD16+DR+ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.* **168**, 3536–3542.
 5. Boring, L., Gosling, J., Chensue, S. W., Kunkel, S. L., Farese Jr., R. V., Broxmeyer, H. E., Charo, I. F. (1997) Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* **100**, 2552–2561.
 6. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. *Annu. Rev. Immunol.* (2008) 26:421–52
 7. Fischer-Smith T, Tedaldi EM, Rappaport J. (2008) *AIDS Research and Human Retroviruses.* 24(3): 417–421
 8. Welch, G. R., Wong, H. L., Wahl, S. M. (1990) Selective induction of Fc γ RIII on human monocytes by transforming growth factor- β . *J. Immunol.* **144**, 3444–3448.
 9. Whittall, T., Wang, Y., Younson, J., Kelly, C., Bergmeier, L., Peters, B., Singh, M., Lehner, T. (2006) Interaction between the CCR5 chemokine receptors and microbial HSP70. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2304–2314.

INFLUENCIA DE FACTORES FARMACOGENÉTICOS Y FARMACOCINÉTICOS EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON METOTREXATO (MTX) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON OSTEOSARCOMA (OS)

Aráoz, Hilda Verónica¹, Dr Walter Cacciavillano², Dra Paula Schaiquevic³, Dra. Adriana Rose², Farm. Paulo Caceres Guido³, Dra. Nieves Rita Victoria Licciardone⁴, Lic. Sinforosa Recalde⁵, Dr Pedro Zubizarreta², Dra Lilien Chertkoff¹

Laboratorio de Biología Molecular- Servicio de Genética¹, Servicio de Hematología-Oncología², Unidad de Farmacocinética Clínica-Área de Farmacia³, Laboratorio Central⁴, Depto. Enfermería CIM 74⁵. Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P Garrahan”, Ciudad de Buenos Aires, Argentina
Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P Garrahan”

Parte de los resultados de este proyecto fueron presentados a diferentes congresos:

PHARMACOKINETIC, PHARMACOGENETIC AND PHARMACODYNAMIC STUDY OF HIGH DOSE METHOTREXATE IN PEDIATRIC OSTEOSARCOMA PATIENTS AT A SINGLE INSTITUTION IN ARGENTINA. Schaiquevich P, Porta A, Araoz V, Caceres Guido P, Licciardone N, Rose A, Recalde S, Chertkoff L, Zubizarreta P, Cacciavillano W. 44th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) 2012, London, United Kingdom, 5th–8th October, 2012 Volume 59, Issue 6, pages 965–1152, 1 December 2012. (Abstract).

HIGH-DOSE METHOTREXATE IN PEDIATRIC OSTEOSARCOMA PATIENTS. IMPLEMENTING A POPULATION PHARMACOKINETIC/PHARMACOGENETIC STUDY IN ARGENTINA. Schaiquevich P, Caceres G P, Licciardone N, Araoz V, Lagomarsino E, Rose A, Chertkoff L, Zubizarreta P, Cacciavillano W. 12th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology. Stuttgart, Alemania 2 al 6 de Octubre de 2011. Ther Drug Monit · Volume 33, Number 4, 81. 2011. (Abstract)

INTRODUCCIÓN

El osteosarcoma (OS) es el tumor óseo primario más frecuente en edad pediátrica¹. Con el advenimiento de la quimioterapia y los avances en cirugía ortopédica, la sobrevida global a 5 años de los pacientes con osteosarcoma localizado ha alcanzado valores de un 60-70% y, de aquellos con enfermedad metastásica de un 20-30².

Los agentes quimioterápicos activos contra el osteosarcoma son restringidos, entre ellos, el metotrexato (MTX). El MTX, un antimetabolito análogo del ácido fólico, ingresa a las células por difusión pasiva y por un meca-

nismo de transporte activo mediado por el transportador de folato reducido 1 (RCF1)³. En el interior celular, el MTX y sus formas poliglutamatos interfieren en el ciclo de homocisteína-folato y con la síntesis de *ново* de purinas a través de la inhibición de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR)⁴. Los poliglutamatos de MTX inhiben también la timidilato sintetasa y la síntesis de pirimidinas y, además, bloquean la síntesis de purinas⁵, ejerciendo así su efecto antineoplásico. Finalmente, el MTX intracelular sale de la célula a través de proteínas transportadoras como la proteína de multiresistencia a drogas MRP2 (Figura 11).

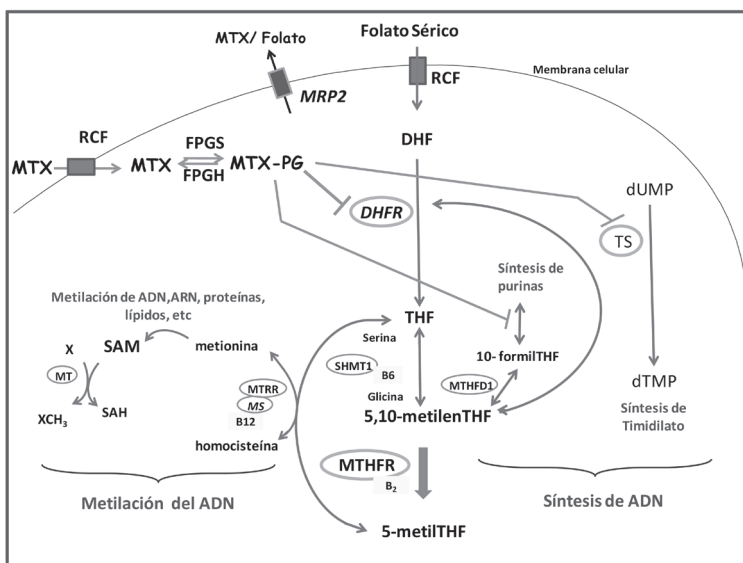


Figura 11. Esquema del metabolismo del folato y puntos de acción del MTX. (Adaptado de referencia 8). Los poliglutamatos de MTX (**MTX-PG**) inhiben a DHFR, TS y la síntesis de *ново* de purinas. De esta forma, alteran la homeostasis del folato y afectan, además, la síntesis, folato dependiente, de DNA, RNA y proteínas. *Transportadores*: **RCF1**, transportador de folato reducido 1, **MRP2** transportador tipo ATP binding cassette. *Enzimas*: **FPGS**, poliglutamato sintetetasa; **FPGH**, folilpoliglutamato hidrolasa; **MTHFR**: enzima metilentetrahidrofolato reductasa; **MT**, metil transferasa.; **MTRR**, metionina sintetasa reductasa, **MS** metionina sintetasa; **SAH**, S-adenosil homocisteína, **MTX**, metotrexato; **X**, diferentes sustratos para metilación. Vitaminas **B2**, **B6** y **B12** son cofactores en la vía metabólica.

El MTX se excreta mayoritariamente en forma inalterada por vía renal. La farmacocinética de la droga presenta una alta variabilidad inter-individual aún con función renal y hepática normales y adecuada hidratación (6,7).

En el tratamiento del osteosarcoma, el MTX es utilizado a altas dosis. Sin embargo, su aplicación resulta aún controvertida ya que la respuesta de los pacientes al tratamiento es muy heterogénea y no existen estudios randomizados que demuestren su superioridad, si bien es de uso estándar en los protocolos de tratamiento actuales⁹. Aunque a la variabilidad en la respuesta a drogas contribuyen diferentes factores como edad, sexo, función orgánica, interacciones entre drogas y naturaleza de la enfermedad, se ha observado que una parte substancial estaría determinada por la presencia de variantes genéticas en las moléculas que participan en los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos. De este modo, la presencia de variantes genéticas en moléculas involucradas en la vía de folato puede influir tanto en la toxicidad como en la eficacia de la quimioterapia con MTX. Hasta el momento, no hay muchos estudios realizados en pacientes con osteosarcoma. Patiño-García y colaboradores¹⁰ hallaron una frecuencia significativamente mayor del genotipo TT para la variante C677T del gen *MTHFR* en un grupo de niños que presentó toxicidad hematológica severa.

Asimismo, los niveles plasmáticos y la exposición sistémica a un fármaco medida como el área bajo la curva, parecen relacionarse también con la toxicidad y eficacia de la droga. Delepine y colaboradores¹¹, hallaron que la respuesta histológica y la sobrevida en pacientes con osteosarcoma se correlacionaban con una concentración máxima (Cmax) de MTX mayor a 1000 mM al finalizar la infusión de 4 horas.

En nuestro país aun existe escasa información acerca de la influencia de factores farmacogenéticos y farmacocinéticos en la respuesta al tratamiento de este tumor. El objetivo de este proyecto fue estudiar la asociación entre variantes genéticas de moléculas relevantes en los procesos farmacológicos del MTX, la variabilidad farmacocinética y la respuesta al tratamiento (eficacia-seguridad) en niños con osteosarcoma.

PACIENTES Y METODOLOGÍA

Pacientes:

Se incluyeron 22 pacientes menores de 16 años con diagnóstico histológico de osteosarcoma, en tratamiento según protocolo GLATO 2006 (Proto-

colo del Grupo Latino-Americano de Tratamiento de Osteosarcoma), seguidos por el Servicio de Hematología-Oncología del Hospital Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”. Este protocolo incluye la administración de 12 g/m² de MTX en infusión endovenosa de 4 horas.

El proyecto fue aprobado por el comité de Ética y Docencia e Investigación del Hospital. Los padres de los pacientes firmaron un consentimiento informado y los pacientes un asentimiento informado. Fue un estudio prospectivo, clínico-farmacocinético-farmacogenético iniciado en enero de 2010. Hasta finales de 2012 ingresaron 32 pacientes, de ellos, 22 aceptaron participar en el trabajo.

Análisis molecular

Se obtuvo ADN a partir de muestras de sangre periférica de los pacientes mediante técnicas convencionales¹².

Análisis de variantes genéticas:

La variante genética c.80G>A en el gen *RCF1*, c.-24C>T en el gen *ABCC2* que codifica para la proteína MRP2, c.2756A>G en *MS* y las variantes más comunes en *MTHFR*, C677T (c.665C>T) y A1298C (c.1286A>C), se estudiaron mediante PCR y posterior digestión con enzimas de restricción (13, 14, 15, 16). Los fragmentos se visualizaron en geles de agarosa de resolución ultrafina. La delección de 19 pares de bases en el gen de la *DHFR* se detectó mediante una PCR alelo específica (17) (Tabla 1).

Tabla 1: Principales características de las variantes genéticas analizadas

Gen	Variante	Exón/intrón	Identificación	Secuencia de Oligonucleótidos	Temperatura annealing	Tamaño del producto amplificado	Enzima de Restricción	Referencia
<i>MTHFR</i>	c.665C>T	p.Ala222Val	exón 4	rs1801133	5'-CCTTGAACGGTGGAGGCC-3' F 5'-CAAAGAAAAGCTGCGTGATGAT-3' R	59°C	158 bp	Hinf I
	c.1286A>C	p.Glu429Ala	exón 7	rs1801131	5'-GCAAGTCCCCCAAGGAGG-3' F 5'-GTCCCACTTCCAGATC-3' R	54°C	145 bp	Mbo II
								Wielmes et al. 2001
<i>DHFR</i>	19 pb inserción/delección		intrón 1		5'-CCACGGTCGGGGTACCTGGG-3' F 5'-ACGGTCGGGGTGGCGGACTC-3' mut 5'-AAAAGGGGAATCCAGTCGG-3' R	62°C	113 y 92 bp	
								Johnson et al. 2004
<i>RCF1</i>	c.80A>G	p.His27Arg	exón 2	rs1051266	5'-AGTGTCACTTCGTCCCCTC-3' F 5'-CTCCCGCGTGAAGTCTT-3' F	57°C	230 bp	Cfo I
								Chango et al. 2000
<i>MS</i>	c.2756A>G	p.Asp919Gly	exón 26	rs1805087	5'-TGTTCCAGACAGTTAGATGAAATC-3' F 5'-GATCCAAAGCCTTTTACACTCCTC-3' F	55°C	211 bp	Hae III
								Habib et al. 2005
<i>MRP2</i>	c.-24C>T		5'UTR	rs717620	5'-ATGGTTGGGATGAAAGGTCA-3' F 5'-AATAATAATCTGGACTGCGTCTGGATC-3' R	55°C	150 bp	Taq alfa I
								Rau et al. 2006

F: forward, R: reverse

Análisis Farmacocinético

En 12 pacientes se obtuvieron los niveles plasmáticos de MTX luego de 4, 24, 48 y 72 horas de finalizada la infusión. Las concentraciones plasmáticas de MTX fueron realizadas por Inmuno ensayo por detección de flourescencia polarizada (FPIA, TDx, Abbot). El aclaramiento de MTX fue calculado utilizando la velocidad de infusión de la droga y la concentración alcanzada en el estado estacionario. Se determinó la concentración plasmática al final de la infusión (Cmax) y el área bajo la curva (AUC).

PARÁMETROS CLÍNICOS, DE TOXICIDAD Y EFICACIA

Parámetros clínicos

Se registraron los datos de edad, sexo, subtipo histológico y localización del tumor.

Evaluación toxicidad

Se evaluó la presencia de toxicidad hepática, dermatológica (cutánea-mucosa), hematológica, renal y neurológica. La toxicidad fue evaluada durante los 6 ciclos de 2 infusiones de MTX cada uno, durante 4 horas, de acuerdo a los criterios de toxicidad NCI CTCAE versión 3.0. (http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcae3.pdf)

Estos criterios establecen cinco grados de severidad. Para fines del análisis de asociación la toxicidad fue considerada como una variable dicotómica (toxicidad severa (grado 3-4): **presencia vs ausencia**).

También se registraron los atrasos en el inicio de los ciclos de MTX y sus principales motivos.

Marcadores de eficacia

• **porcentaje de necrosis tumoral:**

El grado de respuesta histológica indicó el efecto o falla de la quimioterapia:

Grado I	poco o ningún efecto de quimioterapia
Grado II	respuesta parcial, representada por más de 50% de necrosis tumoral. Tumor viable está presente.
Grado III	más de 90% del tumor se encuentra necrótico, sin embargo se encuentran focos de células tumorales (posiblemente viables)
Grado IV	máximo efecto quimioterápico. Ninguna célula tumoral encontrada.

Para el análisis se consideró: **buena respuesta** a la quimioterapia un porcentaje de necrosis tumoral mayor al 90%; **pobre respuesta** un porcentaje menor al 90%.

- **sobrevida libre de eventos**

Es el tiempo transcurrido desde el momento del diagnóstico del tumor hasta la fecha de la primera recurrencia, progresión de la enfermedad, o recaída, aparición de una segunda enfermedad maligna, muerte del paciente. En caso que el paciente no presentó eventos es el tiempo entre el diagnóstico del tumor y el último control en el hospital.

- **sobrevida global**

Es el tiempo transcurrido desde el diagnóstico del tumor hasta el fallecimiento o última visita médica.

Análisis Estadístico

El análisis de asociación entre genotipos y presencia de al menos un evento de toxicidad severa se efectuó mediante tablas de contingencia y *Test* Exacto de Fisher. La asociación entre parámetros de exposición a la droga y presencia de toxicidad severa o variantes genéticas, se utilizó la Prueba de Mann-Whitney.

La probabilidad de sobrevida libre de eventos (pSLE) y de sobrevida global (pSG) fue estimada por el método de Kaplan-Meier para los pacientes con los diferentes genotipos (18). La comparación entre las curvas se realizó aplicando el *Test* de Log-Rank (19).

El análisis estadístico fue realizado utilizando la aplicación informática SPSS (versión 15.0) y StatXact (versión 3.1).

RESULTADOS

Características clínicas

En el presente trabajo se incluyeron 22 pacientes con diagnóstico de osteosarcoma. Sus principales características clínicas se detallan en la tabla 2.

Análisis farmacocinético

Se analizaron 59 ciclos de altas dosis de MTX en 12 niños. La mediana de la dosis de MTX administrada fue de 17,2 g (rango: 8,4-22,2). La mediana de la concentración plasmática de MTX al final de la infusión de 4 horas fue de 1100 mM (rango: 714 – 1735 mM). La mediana del clearance de creatinina fue de 145.7 ml/min/1.73m² (rango 119.6-200.7) y fue estimada por la fórmula de Schwartz. La mediana del AUC fue de 6529 DM*h (rango: 5999-11470).

Tabla 2: Características clínicas de los pacientes con Osteosarcoma

		N	%
Edad al diagnóstico	Mediana	13,6	
	Rango	3,9-15,9	-
Género	femenino	12	54,5
	masculino	10	45,5
	total	22	
Localización	fémur	12	80,0
	húmero	5	33,3
	tibia	5	33,3
	total	22	
Subtipo histológico	osteoblástico	13	86,7
	osteoblástico-condroblástico	2	13,3
	total	15	
Respuesta al tratamiento (% de necrosis tumoral)*	Buena (mayor a 90% de necrosis tumoral)	8	50,0
	Pobre (menor al 90%)	8	50,0
	total	16	
	<i>*Seis pacientes no fueron evaluables para % de necrosis tumoral</i>		
Presencia de Metástasis	ausente	14	63,6
	al diagnóstico	8	36,4
	total	22	
Estado	vivo	14	63,6
	fallecido	8	36,4
	total	22	

Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas

Las frecuencias genotípicas y alélicas para las 6 variantes genéticas estudiadas en 5 genes de la vía del folato se detallan en la tabla 3. Todos los genotipos estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$).

Tabla 3: Distribución de variantes genéticas en 22 niños con Osteosarcoma

c.665C>T en <i>MTHFR</i>	n	%	c.80A>G en <i>RFC1</i> **	n	%
CC	10	45,5	GG	5	23,8
CT	8	36,4	GA	14	66,7
TT	4	18,2	AA	2	9,5
total	22	100	total	21	100
Frecuencia del alelo T : 0,4			Frecuencia del alelo A : 0,4		
c.1298A>C en <i>MTHFR</i>	n	%	c.-24C>T en <i>ABCC2</i>	n	%
AA	11	50,0	CC	15	75,0
AC	11	50,0	CT	6	20,0
CC	0	-	TT	1	5,0
total	22	100	total	22	100
Frecuencia del alelo C : 0,3			Frecuencia del alelo T : 0,18		
19 pb INDEL en <i>DHFR</i>	n	%	c.2756A>G en <i>MS</i>	n	%
no del* homocigota	7	31,8	AA	18	81,0
no del/del	7	31,8	AG	3	14,3
del* homocigota	8	36,4	GG	1	4,8
total	22	100	total	22	100
Frecuencia del alelo del : 0,5			Frecuencia del alelo G : 0,11		
*del: delección, pb: pares de bases			**Para la variante en <i>RFC1</i> en un paciente no fue posible determinar el genotipo.		

Variantes Genéticas, Farmacocinética y Toxicidad

La toxicidad al tratamiento fue evaluada durante los 6 ciclos de altas dosis de MTX. En este análisis se incluyeron 16 pacientes, se evaluaron 67 ciclos de dos infusiones de MTX cada uno de ellos. La toxicidad severa más frecuentemente encontrada fue la hepática (Figura R1).

En lo referido a las variantes genéticas y los eventos de toxicidad severa, se ha observado que los pacientes con al menos un alelo T para la variante C677T en *MTHFR* presentaron una proporción ligeramente mayor de toxicidad hematológica severa y de mucositis severa. Por otro lado, se ha detectado que en el grupo de pacientes con al menos un alelo delecionado en el gen de *DHFR* hubo una tendencia a mayor proporción de eventos de hepatotoxicidad severa. Todos los niños con genotipo CC para la variante c.-24C>T en *ABCC2*, asociada a una expresión normal del gen, tuvieron un atraso en el inicio de quimioterapia en alguno de los ciclos evaluados.

Para las otras variantes genéticas la distribución de eventos severos fue similar para cada uno de los genotipos (Tabla 4).

Figura R1. Distribución porcentual de eventos severos (grado 3-4) de toxicidades más frecuentes en pacientes con osteosarcoma (n=16) durante las infusiones de MTX a altas dosis.

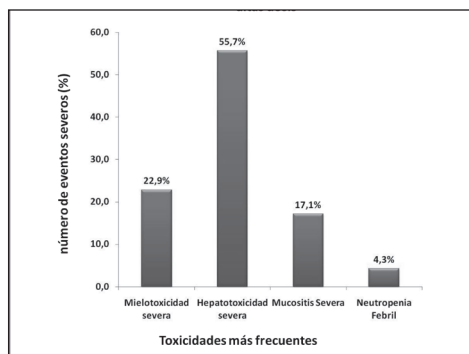


Tabla 4: Asociación de las variantes genéticas y presencia de algún evento de toxicidad severa en una serie de 16 niños con osteosarcoma.

Variante c.665C>T en <i>MTFHR</i> y toxicidad severa										
Genotipos	Atraso en *QMT		Hematotoxicidad Severa		Hepatotoxicidad Severa		Mucositis severa		Neutropenia Febril	
	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no
CC	8	2	3	7	7	3	5	5	1	9
CT+TT	5	1	5	1	5	1	5	1	2	4
p (test exacto de Fisher)	1,00		0,11		1,00		0,30		0,51	
Variante 19 pb INDEL en <i>DHFR</i> y toxicidad severa										
	Atraso en *QMT		Hematotoxicidad Severa		Hepatotoxicidad Severa		Mucositis severa		Neutropenia Febril	
	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no
no del* homocigota	5	2	4	3	4	3	4	3	1	6
no del/del + del* homocigota	8	1	4	5	8	1	6	3	2	7
p (test exacto de Fisher)	0,55		1,00		0,26		1,00		1,00	
Variante c.80A>G en <i>RFC1</i> y toxicidad severa										
	Atraso en *QMT		Hematotoxicidad Severa		Hepatotoxicidad Severa		Mucositis severa		Neutropenia Febril	
	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no
GG	2	1	2	1	2	1	1	2	0	3
GA+AA	11	2	6	7	10	3	9	4	3	10
p (test exacto de Fisher)	0,48		1,00		1,00		0,51		1,00	
Variante c.24C>T en <i>ABCC2</i> y toxicidad severa										
	Atraso en *QMT		Hematotoxicidad Severa		Hepatotoxicidad Severa		Mucositis severa		Neutropenia Febril	
	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no
CC	9	0	5	4	8	1	6	3	3	6
CT+TT	4	3	3	4	4	3	4	3	0	7
p (test exacto de Fisher)	0,06		1,00		0,26		1,00		0,21	
Variante c.2756A>G en <i>MS</i> y toxicidad severa										
	Atraso en *QMT		Hematotoxicidad Severa		Hepatotoxicidad Severa		Mucositis severa		Neutropenia Febril	
	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no
AA	9	2	4	7	9	2	6	5	2	9
AG+GG	3	1	3	1	2	2	3	1	1	3
p (test exacto de Fisher)	1,00		0,28		0,51		0,60		1,00	

*quimioterapia

En cuanto a la farmacocinética del MTX y su asociación con toxicidad, se detectó que los niños que presentaban un mayor AUC tenían una frecuencia ligeramente más alta de hepatotoxicidad severa ($p=0,12$).

No se detectó una asociación significativa entre las variantes genéticas y la concentración plasmática de MTX a las 4 horas y 24 horas. Cuando se analizó la asociación entre las variantes genéticas y el AUC, se observó que los pacientes que presentan al menos un alelo alterado en MRP2 (CT+TT) tuvieron valores ligeramente más altos de AUC que los pacientes con genotipo CC, ($p=0,55$).

Variantes Genéticas y Parámetros de Eficacia

La respuesta histológica pudo evaluarse en 16/22 pacientes. El 50% de los niños tuvieron un porcentaje de necrosis tumoral mayor al 90% y, por lo tanto, buena respuesta histológica.

Cuando se evaluaron las variantes genéticas y el porcentaje de necrosis tumoral, se observó que en el grupo de pacientes con al menos un alelo *T677* para *MTHFR*, 5/7 pacientes tuvieron buena respuesta histológica, mientras que entre los pacientes con genotipo CC, 6/9 tuvieron una pobre respuesta ($p=0,31$; *test* exacto de Fisher). La confirmación de este hallazgo en un mayor número de paciente podría indicar que la presencia de la variante *T677* asociada a una disminución de la actividad de *MTHFR*, podría asociarse a una buena respuesta histológica a la quimioterapia. La distribución de los genotipos para las otras variantes fue similar entre los pacientes con buena y pobre respuesta histológica.

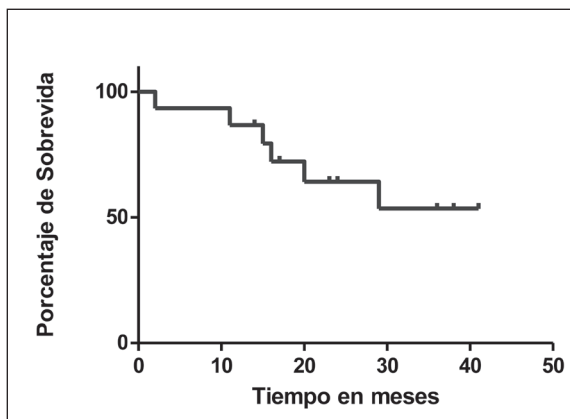
El 45,4% de los pacientes ($n=10$) presentaron eventos: 2 pacientes presentaron recaída (metástasis pulmonar), seis, progresión de enfermedad, uno muerte por toxicidad y uno muerte en remisión completa.

Actualmente, están vivos 14 pacientes y ocho fallecieron; la causa más frecuente de muerte fue la progresión de la enfermedad (75% de los casos).

La curva de sobrevida global (SG) para el grupo de pacientes estudiados se muestra en la figura R5. La probabilidad de SG a los tres años fue de 53%.

El análisis de asociación entre las variantes genéticas y los parámetros de eficacia del tratamiento fue exploratorio ya que el tamaño muestral resultó limitado. El análisis independiente de cada una de las variantes genéticas estudiadas no mostró asociación significativa con los parámetros de sobrevida evaluados.

Figura R2. Porcentaje de SObrevida Global en 15 niños con osteosarcoma



DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó la caracterización de 6 variantes genéticas en 5 moléculas involucradas en la farmacología del metotrexato en 22 pacientes pediátricos con osteosarcoma. La finalidad del estudio fue evaluar la asociación de las variantes con parámetros farmacocinéticos del MTX y con la respuesta al tratamiento (eficacia-toxicidad).

Las características clínicas de los pacientes fueron similares a las descritas en otras poblaciones de pacientes con esta patología¹⁰.

En lo que refiere al análisis de toxicidad, la toxicidad hepática y mielotoxicidad severa fueron los eventos adversos más frecuentes durante los ciclos de altas dosis de MTX. En la serie evaluada se vio que los pacientes con genotipo CT y TT para C677T para *MTHFR* tuvieron una tendencia a presentar una mayor proporción de toxicidad hematológica severa. Este hallazgo se encuentra en parcial concordancia con los resultados de Patiño y colaboradores¹⁰ quienes encontraron en 96 niños con osteosarcoma que la presencia del genotipo TT se asociaba a un mayor riesgo de toxicidad hematológica severa. Los resultados también fueron similares a los descritos en un estudio realizado en niños con LLA de nuestro Hospital (20). Los pacientes con al menos un alelo T para la variante C677T mostraron también una tendencia aumentada a presentar mucositis severa. Este hallazgo está de acuerdo

con los resultados de Ulrich y colaboradores (21) quienes describieron una asociación entre la variante C677T y un mayor índice de mucositis en 220 pacientes con leucemia mieloide crónica.

Por otro lado, los niños con al menos un alelo deletado en *DHFR*, tuvieron una tendencia aumentada a presentar hepatotoxicidad severa. Es sabido que la delección 19 bp en el intrón 1 de *DHFR* altera la expresión de este gen (22). Ongaro y colaboradores (23) describieron que los portadores de la delección en *DHFR* presentaban un aumento significativo de eventos toxicidad hepática en un estudio realizado en pacientes adultos con LLA.

En este estudio se inició la caracterización farmacocinética del metotrexato a altas dosis. Se ha observado una ligera asociación entre niveles más altos de AUC para MTX y la presencia de hepatotoxicidad severa. En relación a las variantes genéticas, se detectó que aquellos pacientes con presencia de la variante -24T en el UTR del exón 1 de *ABCC2*, mostraban una tendencia a presentar niveles plasmáticos más altos de MTX. La región en la cual se produce el cambio genético en *ABCC2* es una parte esencial del sitio promotor del gen que se expresa en células hepáticas (24) y este cambio genético podría tener un efecto en la regulación transcripcional de MRP2 (25). La detección de esta asociación en un mayor número de pacientes confirmaría que la presencia del alelo -24T podría afectar la farmacocinética del MTX. En este sentido, Rau y colaboradores (14) describieron que la media del área bajo la curva para MTX fue significativamente más alta en niñas con LLA que presentaban al menos un alelo -24T.

Con respecto a la eficacia del tratamiento, los resultados fueron difíciles de interpretar debido al reducido número de pacientes incluidos. El análisis preliminar de las variantes genéticas y las curvas de supervivencia no mostró una asociación significativa. Sería necesario contar con un mayor número de pacientes y un período de seguimiento más prolongado para confirmar estos datos exploratorios.

La ejecución de este estudio permitió realizar por primera vez en nuestro país, la caracterización farmacogenética y farmacocinética del MTX en niños con osteosarcoma. El reconocimiento de la influencia de variantes genéticas y los parámetros farmacocinéticos, contribuirá a optimizar la terapéutica, brindando a cada paciente una mejor alternativa de tratamiento, maximizando la eficacia y minimizando los efectos adversos a este antineoplásico.

ABSTRACT

Introduction

Although enormous progress has been achieved in the survival rate of childhood osteosarcoma, in 40% of cases the outcome is still fatal. High-dose-methotrexate (HD-MTX) is a standard component for the osteosarcoma treatment. Genetic variants in molecules involved in the folate pathway seem to modulate therapy response to MTX.

The aim of this study was to characterize HD-MTX-pharmacokinetics/pharmacogenetics (PK/PG) and to evaluate the influence of the most common genetic variants in genes of folate pathway on the outcome of treatment (toxicity-efficacy) in Argentinean children with osteosarcoma.

Patients and Methods

Samples from 22 patients treated with GLATO-Protocol-2006 were analyzed. Genetic variants for the genes *RCF1* (c.80G>A), *DHFR* (19-pb-INDEL), *MTHFR* (c.665C>T and c.1286A>C), *MS* (c.2756A>G) and *ABCC2* (c.-24C>T) were identified by PCR-RFLP or allele-specific PCR. MTX plasma concentrations were analyzed by FPIA. The MTX area under the curve (AUC) was calculated. Toxicity was evaluated during HD-MTX cycles according to NCI-CTCAE-v3 criteria. The association between toxicity and genotypes was assessed by Fisher-exact Test. Treatment efficacy was determined histologically by the tumor necrosis percentage and as the overall survival probability, estimated by Kaplan-Meier analysis.

Results

Children who carried at least one 677T allele variant in *MTHFR* showed slight higher proportion of severe hematologic toxicity and severe mucositis. Patients with at least one deleted allele in *DHFR* presented a higher frequency of severe hepatotoxicity events. The median (range) AUC was 6.529 mM*h (5.099-11.472). A trend towards association between AUC and hepatotoxicity was observed. Patients with CT/TT genotype for the c.-24C>T showed slightly higher levels of AUC than children carrying CC genotype. None of the genetic variants evaluated seemed to influence significantly in treatment efficacy parameters.

Conclusion

This is the first PK/PG study in pediatric osteosarcoma patients performed in Argentina. Further studies would be necessary to confirm these results in order to improve HD-MTX treatment for osteosarcoma.

REFERENCIAS

1. Pizzo PA and Poplack DG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Principles and Practice of Pediatric Oncology. 6RD Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. USA 2010, 519-564.
2. Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Ruggieri P, Picci P, Longhi A, Casadei R, Fabbri N, Forni C, Versari M, Campanacci M. Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol*. 2000; 18(24):4016-27.
3. Chabner BA, Donehower RC, Schilsky RL. Clinical pharmacology of methotrexate. *Cancer Treat Rep*. 1981; 65 Suppl 1:51-4.
4. Jacobs, S.A., Adamson, R.H., *et al*. Stoichiometric inhibition of mammalian dihydrofolate reductase by the gamma-glutamyl metabolite of methotrexate, 4-amino-4-deoxy-N-10-methylpteroylglutamyl-gamma-glutamate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1975; 63, 692.
5. Chabner, BA, Allegra, CJ, Curt, GA, *et al*. Polyglutamation of methotrexate Is methotrexate a prodrug? *Journal of Clinical Investigation*. 1985, 76, 907-912.
6. Rodman JH, Reilling MV, Stewart CF, *et al*. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of anticancer drugs in children. *Semin Oncol* 1993; 20:18-19.
7. Rousseau A, Sabot C, Delepine N, Delepine G, Debord J, Lachâtre G, Marquet P. Bayesian Estimation of Methotrexate Pharmacokinetic Parameters and Area Under the Curve in Children and Young Adults with Localised Osteosarcoma. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41¹³: 1095-1104.
8. De Mattia E, Toffoli G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *Eur J Cancer*. 2009; 45(8):1333-51.
9. van Dalen EC, de Camargo B. Methotrexate for high-grade osteosarcoma in children and young adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(1):CD006325. Update in *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;(5):CD006325.
10. Patiño-García A, Zalacáin M, Marrodán L, San-Julián M, Sierrasesúmaga L. Methotrexate in pediatric osteosarcoma: response and toxicity in relation to genetic polymorphisms and dihydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 expression. *J Pediatr*. 2009; 154(5):688-93.
11. Delepine N., Delepine G., Cornille H *et al*. Dose escalation with pharmacokinetics monitoring in methotrexate chemotherapy of osteosarcoma. *Anticancer Res*. 1995; 15:489-494.
12. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3):1215.
13. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, Nicolas JP. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab*. 2000; 70(4):310-5.
14. Rau T, Erney B, Göres R, Eschenhagen T, Beck J, Langer T. High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin Pharmacol Ther*. 2006; 80(5):468-76.

15. Habib EE, Aziz M, Kotb M. Genetic polymorphism of folate and methionine metabolizing enzymes and their susceptibility to malignant lymphoma. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2005; 17(3):184-92.
16. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(7):4004-9.
17. Johnson WG, Stenroos ES, Spychala JR, Chatkupt S, Ming SX, Buyske S. New 19 bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR): a risk factor for spina bifida acting in mothers during pregnancy? *Am J Med Genet A.* 2004; 124A(4):339-45.
18. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1995; 53:457-481.
19. Tarone RE, Wara J. On distribution-free test for equality of survival distribution. *Biometrika* 1997; 64:156.
20. Aráoz, HV, Foncuberta, ME, D'Aloi Karina, Alonso C, Felice MS, Chertkoff L. Pharmacogenetic Study Argentinean Children In With Acute Lymphoblastic Leukemia (All). *European Journal of Human Genetics* vol 20 suppl 1, 158. Junio 2012 (Abstract).
21. Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, *et al.* Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 2000; 98:231-4.
22. Xu X, Gammon MD, Wetmur JG, Rao M, Gaudet MM, Teitelbaum SL, Britton JA, Neugut AI, Santella RM, Chen J. A functional 19-base pair deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (DHFR) and risk of breast cancer in multivitamin users. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(4):1098-102.
23. Ongaro A, De Mattei M, Della Porta MG, Rigolin G, Ambrosio C, Di Raimondo F, Pellati A, Masieri FF, Caruso A, Catozzi L, Gemmati D. Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. *Haematologica.* 2009 Oct;94(10):1391-8.
24. Tanaka T, Uchiyumi T, Hinoshita E, Inokuchi A, Toh S, Wada M, Takano H, Kohno K, Kuwano M. The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology.* 1999; 30(6):1507-12.
25. Zhang Y, Zhao T, Li W, Vore M. The 5'-untranslated region of multidrug resistance associated protein 2 (MRP2; ABCC2) regulates downstream open reading frame expression through translational regulation. *Mol Pharmacol.* 2010; 77(2):237-46.

DETERMINANTES MOLECULARES DEL GEN ENV DEL HIV-1 QUE IMPACTAN EN LA EVOLUCIÓN VIRAL ASOCIADA AL USO DIFERENCIAL DE LOS CO-RECEPTORES CCR5 Y CXCR4

Paula Aulicino, Ma. Florencia Fernandez, Andres Rossi, Cintia Crudeli,
Carlos Rocco, Andrea Mangano, Luisa Sen
Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus, Hospital de Pediatría "J.P. Garrahan"

INTRODUCCIÓN

Las cepas de HIV-1 pueden caracterizarse como X4 o R5 en función de su tropismo, definido como la habilidad para utilizar los co-receptores celulares CXCR4 o CCR5 presentes en las células CD4+, ambos necesarios para la infección. Se considera que las cepas R5/ Macrófago-trópicas o NSI (no Inductoras de Sincicios) son las que se transmiten de un individuo a otro, ya que se encuentran mayoritariamente en primoinfección, mientras que las X4/ T-trópicas o SI (Inductoras de Sincicios) se encuentran en etapas tardías de la enfermedad, asociándose con un importante deterioro inmunológico y clínico [Moore 1997, Ostrowski *et al.* 1998, Daar *et al.* 2007, Koot *et al.* 1993].

En estudios previos, hallamos que el 14% de los niños HIV-1 infectados por transmisión vertical presentaban cepas virales SI en etapas tempranas de la infección (primoinfección), mientras que en los aislados obtenidos de niños en etapas tardías, el 28% de los aislados resultó ser SI [Kopka *et al.* 2002 y datos no publicados de nuestro grupo]. En un pequeño grupo de pacientes (n= 5), se pudieron identificar tanto cepas SI como NSI en muestras obtenidas a distintos tiempos, evidenciando el "switch fenotípico" *in vivo*.

Es posible que este "switch" en el uso de co-receptores esté asociado a una transición gradual en la cual los virus R5 van evolucionando y adquiriendo la capacidad de usar el CXCR4, pasando por un estado intermedio de tropismo dual [Cho *et al.* 1998, Huang *et al.* 2007, Berger *et al.* 1999]. Por otro lado, podría existir una evolución independiente de las sub-poblaciones virales con diferente tropismo que coexisten en el individuo [Fernandez *et al.* 2006, Westby *et al.* 2006] y factores externos influirían en modular la proporción relativa de ambos que se observan *in vivo*. Es nuestro objetivo investigar estas dos hipótesis en el grupo de pacientes con "switch fenotípico".

La determinación del tropismo viral es actualmente un requisito para los pacientes infectados por HIV-1, previo a la prescripción de drogas inhibidoras del CCR5 (Maraviroc, Vicriviroc) ya que solo aquellos individuos que porten exclusivamente cepas **R5** se beneficiarían con estas nuevas drogas. Sin embargo, las metodologías de referencia para la determinación del tropismo de HIV-1 son de alto costo y difícil implementación ya que involucran el cultivo del HIV-1 en líneas celulares CD4+ que expresan diferencialmente uno u otro co-receptor. Dado que existe una correlación entre la secuencia aminoacídica del loop V3 de la gp120 (codificada por el gen *env*) y el tropismo viral, se han desarrollado algoritmos predictivos del tropismo basados en secuencias de esta región del *env* (regla 11/25, algoritmo PSSM, Geno2pheno) que resultan mucho menos costosos y laboriosos que el cultivo viral. Sin embargo, una limitante de estos métodos es que únicamente ponderan cambios aminoacídicos en la región del loop V3 y su sensibilidad es variable de acuerdo al subtipo del HIV-1 y a la población de estudio [Soulie *et al.* 2008, Garrido *et al.* 2008, Jensen *et al.* 2003, Garrido *et al.* 2008]. Además de estar basados en cepas de subtipo B exclusivamente, es posible que los algoritmos necesiten incorporar otras regiones del *env* además del loop V3, ya que recientemente se ha evidenciado que otras regiones del *env* (dentro de gp120 y gp41) también contribuyen a determinar el tropismo viral [Huang *et al.* 2008, Pastore *et al.* 2007, Coetzer *et al.* 2008]. A la vez, características conformacionales de las glicoproteínas de la membrana viral (cores hidrofóbicos, dominios transmembrana, estructuras secundarias, etc..) codificadas en *env* podrían también influir en el uso diferencial de los co-receptores celulares [Stamatatos *et al.* 1993, Watabe *et al.* 2006]. En Argentina, dada la alta frecuencia de variantes HIV-1 de subtipo BF, es aún necesario identificar las mutaciones implicadas en el uso diferencial de co-receptores y evaluar la aplicabilidad de las herramientas actualmente disponibles para la predicción del tropismo, o desarrollar nuevos algoritmos que sean de utilidad para nuestra población.

Nuestro grupo de estudio nos presenta la oportunidad de explorar la evolución del HIV-1 intra-individuo dadas sus características particulares: las muestras a analizar corresponden a infecciones perinatales, en las que se conoce el tiempo de infección y hay virtual ausencia de re-infecciones. Además, la comparación de secuencias virales aisladas de cepas con diferente tropismo de un mismo paciente permite limitar el número de cambios observados y a la vez inferir un orden de causalidad.

El objetivo del trabajo fue estudiar las variaciones genéticas del gen *env* de HIV-1 un grupo de individuos infectados por transmisión vertical que pre-

sentan cambios de tropismo a lo largo de la infección a fin de determinar la concordancia entre el fenotipo observado *in vitro* y el tropismo obtenido por métodos predictivos basados en las secuencias del gen *env*, a la vez de encontrar patrones comunes de cambio entre las variantes con igual tropismo. Además, se analizaron las relaciones filogenéticas entre los clones a fin de determinar el modo de evolución de las variantes virales.

METODOLOGÍA

Determinación del fenotipo del HIV-1 *in vitro*:

En el presente proyecto se utilizaron cepas de HIV-1 previamente caracterizadas en función de sus características fenotípicas y tropismo viral de la siguiente manera:

a) Determinación de la capacidad de inducir la formación de Sincios celulares por infección de células MT-2. Esta es una línea celular que expresa el co-receptor CXCR4, y permite la caracterización de las cepas de HIV-1 como SI/ NSI.

Estudio de la evolución viral intra-huésped mediante el seguimiento del *env*:

a) Amplificación del gen *env* de HIV-1 Se amplificó una región de 700pb correspondiente a las regiones C2- V5 de la gp120 mediante PCR anidada.

b) Clonado y secuenciación: Los amplicones obtenidos por PCR se clonaron en el vector TOPO TA y se transformaron bacterias *E. coli* quimio-competentes. Se obtuvieron de 6 a 12 clones por tiempo de estudio, y luego de amplificarlos se secuenciaron en el secuenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). Las secuencias fueron analizadas con Softwares para análisis de secuencias (Lasergene, Chromas y MEGA 3.1).

c) Predicción del tropismo viral: Se utilizaron los algoritmos bioinformáticos disponibles on-line Geno2Pheno y PSSM.

d) Estudios filogenéticos: las secuencias se alinearon y editaron con MEGA 5.05. Se utilizó el métodos de Neighbor-Joining para la construcción de árboles filogenéticos, bajo el modelo de Tamura-Nei.

RESULTADOS

La frecuencia de clones X4 y R5 fue diferente para cada uno de los individuos estudiados, y resultó concordante con el fenotipo determinado en cultivo sobre células MT-2 en los casos 3 y 4 pero no en los casos 1 y 2. Contrariamente a lo esperado, en el individuo 1 no se encontró presencia de clones X4 en ninguno de los tiempos estudiados (Tabla 1).

Tabla 1: Frecuencia de clones X4 y R5 de los 4 individuos estudiados

Casos	Edad (años)	Fenotipo en cultivo	% clones X4	% clones R5	Nro. clones
1	3	SI	0	100	12
1	4	NSI	0	100	10
1	10	SI	0	100	6
2	9	NSI	50	50	9
2	10	NSI	100	0	4
2	11	SI	100	0	9
3	12	SI	100	0	12
3	16	NSI	28	72	12
3	19	SI	50	50	12
4	9	NSI	43	57	10
4	13	NSI	22	78	8
4	15	SI	100	0	10

De acuerdo al tropismo viral caracterizado con los programas Geno-2Pheno y PSSM (basados en el loop V3), se agruparon y compararon los clones X4 y R5 de cada individuo a fin de identificar cambios aminoacídicos que pudieran actuar como determinantes del tropismo viral fuera del loop V3, ya que la secuencia analizada incluye también las regiones C2, C3, V4 y C5. Aunque no pudieron identificarse cambios asociados al tropismo viral que estuvieran conservados en todos los clones con igual tropismo de los 4 indi-

viduos, en el individuo 1 se observó la presencia de un sitio de glicosilación únicamente en los clones R5 que estaba ausente en los clones X4.

Los análisis filogenéticos de los clones obtenidos de los individuos 2, 3 y 4 demostraron divergencia entre los clones X4 tempranos y tardíos, sugiriendo un origen independiente de poblaciones virales con igual tropismo. En el individuo 1 todos los clones R5 obtenidos fueron muy similares entre sí, no pudiendo evidenciar diversidad de variantes en este individuo a pesar de su fenotipo cambiante.

La determinación del subtipo del HIV-1 realizada por comparación de las secuencias nucleotídicas con subtipos de referencia para el grupo M demostró que el HIV-1 de los 4 individuos estudiados es de subtipo F en el gen env, lo cual era esperado dada la alta frecuencia de recombinantes BF en nuestro país.

CONCLUSIONES

Los hallazgos demuestran la necesidad de mejorar el conocimiento de los determinantes del tropismo en el gen env del HIV-1 para aumentar la sensibilidad de los métodos predictivos usados actualmente previo a la administración de drogas inhibidoras de los co-receptores. La falta de correlación entre los métodos fenotípicos y los basados en el genotipo podrían deberse a factores no considerados en los algoritmos como ser el subtipo viral, la presencia de sitios de glicosilación, entre otros.

En 3 individuos se observó divergencia entre clones con tropismo X4 tempranos y tardíos, sugiriendo que las variantes X4 mas citopatogénicas y asociadas con inmunosupresión y progresión a SIDA no tienen un único origen, sino que podrían provenir de fuentes diferentes según el momento de estudio.

RESUMEN EN ESPAÑOL

El tropismo del HIV-1 depende del co-receptor que utiliza el virus para ingresar a la célula blanco. In vitro, el tropismo viral puede determinarse mediante el ensayo de formación de sincicios sobre las células MT2, siendo las cepas inductoras de sincicios celulares (SI) las que usan el co-receptor CXCR4 y las no inductoras de sincicios celulares (NSI) las que usan el co-receptor CCR5. Dado que el HIV-1 interacciona con sus co-receptores por medio de la

gp120 codificada en el gen env, su secuencia puede utilizarse para predecir el tropismo con algoritmos bioinformáticos y caracterizarlo como X4 o R5.

El objetivo del trabajo fue estudiar los determinantes de tropismo viral, la evolución, frecuencia y diversidad de variantes de HIV-1 con tropismo diferencial X4 o R5 en 4 individuos infectados por transmisión vertical que poseían cepas SI y NSI a lo largo del tiempo.

Se amplificó y clonó un fragmento del gen env a partir de células mononucleares totales en 3 tiempos de cada individuo. Se secuenciaron 8-10 clones de cada tiempo y se analizaron con los programas PSSM y Geno2pheno para predecir el tropismo viral (X4/R5) y las relaciones filogenéticas entre los clones se evaluaron por Neighbor-Joining con el programa MEGA 5.05. En tres de los niños estudiados se halló una mezcla de poblaciones HIV-1 X4 y R5 en cada tiempo con una frecuencia mayor a un 50% cuando el tropismo caracterizado era SI. En el cuarto caso, a pesar de fenotípicamente presentar variantes NSI y SI, genotípicamente todos los clones en los tres tiempos presentaron variantes R5. Contrariamente a lo esperado, las variantes X4 tempranas y tardías difieren evolutivamente, sugiriendo un origen independiente.

Los hallazgos demuestran la necesidad de mejorar el conocimiento de los determinantes del tropismo en el gen env del HIV-1 para aumentar la sensibilidad de los métodos predictivos usados actualmente previo a la administración de drogas inhibitoras de los co-receptores.

RESUMEN EN INGLES

The tropism of HIV-1 depends on the co-receptor used by the virus to enter the target cell. In vitro, viral tropism can be determined by the syncytia formation assay on MT2 cells. Syncytia-inducing strains (SI) use the CXCR4 co-receptor and the not syncytia-inducing (NSI) use the CCR5 co-receptor. Since HIV-1 interacts with its co-receptors through gp120 encoded in the env gene, its sequence can be used to predict HIV-1 tropism with bioinformatic algorithms that characterize HIV-1 strains as X4 or R5.

The objective was to study the determinants of viral tropism, evolution, frequency and diversity of HIV-1 variants with differential X4 or R5 tropism in 4 HIV-1 vertically-infected individuals with SI and NSI strains over time.

An env gene fragment was amplified and cloned from peripheral blood mononuclear cells at 3 study periods for each individual. 8 to 10 clones were sequenced and analyzed with PSSM and geno2pheno programs to predict viral

tropism (X4 or R5). Phylogenetic relationships among clones were evaluated by Neighbor-Joining with the program MEGA 5.05. In three of the individuals we found a mixture of HIV-1 populations X4 and R5 at each time with a frequency greater than 50% when the phenotype was SI. In the fourth case, all clones were characterized as R5 in discordance with the viral phenotype. Contrary to expectations, most individuals showed a different evolution of early and late X4 variants, suggesting an independent origin of strains with concordant tropism.

Our findings indicate that determinants of tropism still need to be identified in the HIV-1 *env* gene in order to improve the sensitivity of tropism-prediction methods currently used before the administration of co-receptors inhibitor drugs.

REFERENCIAS

1. Aulicino P., Crudeli C., Rocco C., Mangano A., Sen L. Evolución intrahuesped de sub-poblaciones de HIV-1 con diferente tropismo y susceptibilidad a los antirretrovirales. Póster. IX Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, 2008. *Rev Argent Microbiol.* 2008;40 Suppl 1:39.
2. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:657-700.
3. Cho MW, Lee MK, Carney MC, Berson JF, Doms RW, Martin MA. Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. *J Virol* 1998; 72(3):2509-15.
4. Coetzer M, Nedellec R, Salkowitz J, McLaughlin S, Liu Y, Heath L, Mullins JI, Mosier DE. Evolution of CCR5 use before and during coreceptor switching. *J Virol* 2008; 82(23):11758-66.
5. Daar ES, Kesler KL, Petropoulos CJ, Huang W, Bates M, Lail AE, Coakley EP, Gomperts ED, Donfield SM. Baseline HIV type 1 coreceptor tropism predicts disease progression. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 643-649.
6. Fernández G, Llano A, Esgleas M, Clotet B, Esté JA, Martínez MA. Purifying selection of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 variants in AIDS subjects that have developed syncytium-inducing, CXCR4-tropic viruses. *J Gen Virol* 2006; 87:1285-94.
7. Garrido C, Roulet V, Chueca N, Poveda E, Aguilera A, Skrabal K, Zahonero N, Carlos S, García F, Faudon JL, Soriano V, de Mendoza C. Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(3):887-91.
8. Huang W, Eshleman SH, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos EE, Whitcomb JM, Young AM, Donnell D, Mmiro F, Musoke P, Guay LA, Jackson JB, Parkin NT, Petropoulos CJ. Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of

- viral populations. *J Virol* 2007; 81(15):7885-93.
9. Huang W, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Reeves JD, Whitcomb JM, Parkin N, Petropoulos CJ. Coreceptor tropism can be influenced by amino acid substitutions in the gp41 transmembrane subunit of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* 2008; 82(11):5584-93.
 10. Jensen MA, Li FS, van't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, McLaughlin S, Shankarappa R, Margolick JB, Mullins JI. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 *env* V3 loop sequences. *J Virol* 2003; 77(24):13376-88.
 11. Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, Miedema F, Schellekens PT, Tersmette M. Prognostic value of HIV-1 syncytium inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993; 118: 681- 688.
 12. Kopka J, Batalla M, Mangano A, Mecikovsky D, Bologna R, Sen L. Relevance of viral phenotype in the early AIDS outcome of pediatric HIV-1 primary infection. *Pediatr Res* 2002; 52(4):475-80.
 13. Moore JP. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* 1997; 276: 51-52.
 14. Ndungú T, Renjifo B, Essex M, et al. Construction and analysis of an infectious human immunodeficiency virus type 1 subtype C molecular clone. *J Virol*. 2001; 75: 4964-4972.
 15. Ostrowski MA, Justement SJ, Cantanzaro A, Hallahan CA, Ehler LA, Mizell SB, Kumar PN, Mican JA, Chun TW, Fauci A. Expression of chemokine receptors and CCR5 in HIV-1 infected and uninfected individuals. *Journal of Immunology* 1998; 161: 3195-3201.
 16. Pastore C, Nedellec R, Ramos A, Hartley O, Miamidian JL, Reeves JD, Mosier DE. Conserved changes in envelope function during human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching. *J Virol* 2007; 81(15):8165-79.
 17. Rodríguez M, Chen Y, Craigo J, et al. Construction and characterization of an infectious molecular clone of HIV-1 subtype A of Indian origin. *Virology* 2006; 345: 328-336.
 18. Soulié C, Derache A, Aimé C, Marcelin AG, Carcelain G, Simon A, Katlama C, Calvez V. Comparison of two genotypic algorithms to determine HIV-1 tropism. *HIV Med* 2008;9(1):1-5.
 19. Stamatatos L and Cheng-Mayer C. Evidence that the structural conformation of envelope gp120 affects human immunodeficiency virus type 1 infectivity, host range, and syncytium-forming ability. *J Virol* 1993; 67:5635–5639.
 20. Watabe T, Kishino H, Okuhara Y, Kitazoe Y. Fold Recognition of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 V3 Loop and Flexibility of Its Crown Structure During the Course of Adaptation to a Host. *Genetics* 2006; 172:1385–1396.
 21. Westby M, Lewis M, Whitcomb J, Youle M, Pozniak AL, James IT, Jenkins TM, Perros M, van der Ryst E. Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol* 2006; 80:4909-20.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA TH17 SOBRE PACIENTE CON TUBERCULOSIS SENSIBLE Y TUBERCULOSIS MULTIRRESISTENTE A DROGAS"

Lic. Juan Ignacio Basile

Instituto de Medicina Experimental (IMEX) - CONICET. Academia Nacional
de Medicina.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica cuyo agente etiológico es *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), un bacilo intracelular obligatorio que ingresa en su huésped por vía aérea a través de pequeñas gotas que lo contienen. En el pulmón, parasita a los macrófagos alveolares (MΦ) siendo las primeras células en ser infectadas por *Mtb*¹. Los MΦ infectados, como así también las células dendríticas inician una respuesta inflamatoria con influjo de neutrófilos (PMN), linfocitos y monocitos (Mo) por efecto de factores quimiotácticos presentes en el foco infeccioso. La respuesta inmune generalmente contiene la infección, pero no elimina la bacteria, aunque el daño se minimiza por fagocitosis de la bacteria con posterior formación de una barrera de células inflamatorias rodeando al MΦ infectado que se conoce como granuloma.

En Argentina, la TB multirresistente a drogas (MDR-TB) emergió como consecuencia de un brote hospitalario en pacientes con SIDA (2,3), en la ciudad de Buenos Aires y Rosario a principios de los 90, diseminándose luego en la comunidad (4, 5). Se considera que una cepa de *Mtb* es MDR cuando presenta resistencia a las dos drogas antituberculosas por excelencia, isoniazida y rifampicina⁶. Estudios epidemiológicos, bacteriológicos como así también de genotipificación, permitieron identificar a la cepa M, aislada en el Hospital Múñiz y perteneciente a la familia Haarlem, y a la cepa Ra, aislada en la ciudad de Rosario (familia Latinoamericana-Mediterránea) ambas multirresistentes a drogas. La cepa M en particular, resultó ser muy próspera en nuestro país a pesar de haber adquirido varios genes de resistencia sin perder capacidad de diseminación.

Clínicamente, la evolución de la TB sensible (S-TB) y la MDR-TB es diferente. La MDR-TB es una forma más severa de la TB con evolución desfavorable especialmente si está asociada a HIV. Además, los genotipos MDR tienden

a ser más virulentos, generan más cavidades y provocan dificultades respiratorias más severas con una gran carga bacilar⁷. Se sabe que la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ antígeno-específicos productores de IFN- γ y citotóxicos (CTL) son críticos para el control de la infección por *Mtb*. Existen linfocitos T que modulan la respuesta inmune al *Mtb*. Recientemente se ha descrito una nueva subpoblación de linfocitos T CD4⁺ que secretan interleuquina 17 (IL-17), llamados Th17, que se distinguen de los linfocitos T colaboradores (Th1 y Th2) convencionales y de los T reguladores (Treg) (8-9). En humanos, los Th17 se diferenciarían en presencia de IL-1 β mientras que IL-6, TGF- β e IL-23 amplificarían esta respuesta (10,11). Los Th17 son poco sensibles a la inhibición por IL-4 o por células Treg y presentan escasa actividad CTL. Se ha demostrado en pacientes con S-TB un aumento *in vitro* de linfocitos T CD4⁺IL-17⁺ en respuesta a la cepa de referencia H37Rv de *Mtb*, contribuyendo en los procesos inflamatorios característicos de la TB.

La IL-17 es una citoquina proinflamatoria que juega un papel importante en la autoinmunidad¹², rechazo de injertos¹³ y en la respuesta inmune contra patógenos intracelulares (14). Dentro de las funciones asignadas a la IL-17 se encuentran inducir el reclutamiento y activación de los PMN y desencadenar en ellos la producción y liberación de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias (15). A pesar de que los linfocitos T CD4⁺ son la principal fuente de aporte de IL-17 (16, 17-21) también se ha descrito dicha producción para las poblaciones de células T CD8⁺, linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺, células NK y células NKT (22-24)

En los últimos años nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las cepas M y Ra de *Mtb* inducen un perfil de linfocitos T colaboradores 1/T-colaboradores 2 (Th1/Th2) alterado en células de individuos sanos (PPD⁺HD) y de pacientes con TB activa, siendo la cepa M un inductor débil de IFN y de CD8-dependiente de la actividad citotóxica (21).

El objetivo general de este proyecto fue investigar la respuesta Th17 en linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y T $\gamma\delta$ ⁺ enfrentados a diferentes cepas de *Mtb* pertenecientes a las familias Haarlem y Latinoamericana-Mediterránea aisladas en Argentina y su contribución a la fisiopatogenia tanto en pacientes con S-TB o MDR.

En el presente trabajo, se evaluó la capacidad de las cepas M y Ra para estimular la producción de IL-17 en pacientes con tuberculosis y en PPD⁺HD. Demostramos que las cepas M y Ra aumentan significativamente el nivel de células IL-17⁺. La respuesta TH17 dependió mayoritariamente de células T CD4⁺ y CD8⁺ y en los pacientes con MDR-TB, y se asoció fuertemente con carga antigénica persistentemente alta.

RESULTADOS

En primera instancia comprobamos que la expresión de IL-17 fue superior en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a 48 h en comparación con los cultivos de 5 días. Por lo cual de aquí en más todos los experimentos se realizaron a 48 h Figura 1.

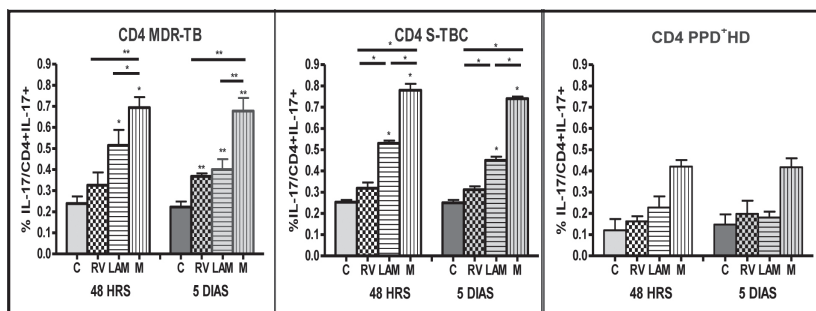


Figura 1: Porcentaje de Linfocitos T CD4⁺IL17⁺ a 48 h y 5 días de estimulación sobre la región de linfocitos. A) Ensayos sobre pacientes con MDR-TB. B) Ensayo sobre pacientes con S-TB. C) Ensayo sobre dadores sanos (PPD+HD).

La capacidad de las cepas MDR-*Mtb* de expandir la población de células IL17 de paciente MDR-TB, S-TB e individuos sanos PPD+HD se evaluó utilizando la cepa de referencia de *Mtb* H37Rv. El porcentaje de los linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y $\gamma\delta$ ⁺ productores de IL-17 se determinó dentro de la región de linfocitos (Figura 2 A, B y C).

Dado que las células Th17 expresan de manera constitutiva el receptor para IL-23 (IL-23R) (25), dicha expresión se determinó en CMSP de paciente con MDR-TB, S-TB y PPD+HD. Los cultivos *ex vivo* de CMSP de pacientes con TB mostraron porcentajes de linfocitos T IL23R⁺ más elevados en comparación con los linfocitos T IL23R⁺ procedentes de CMSP de PPD+HD (Figura 3). En línea con esto último, las células T $\gamma\delta$ ⁺ arrojaron datos más altos de células IL23R⁺ en comparación con la subpoblación de linfocitos T CD4⁺. Ésta última diferencia no pudo ser evidenciada en PPD+HD. Además, luego de la estimulación con la diferentes cepas de *Mtb* pudimos observar que la cepa M fue la mayor inductora y la única capaz de generar dicha expansión en cultivos de CMSP de PPD+HD Figura 4.

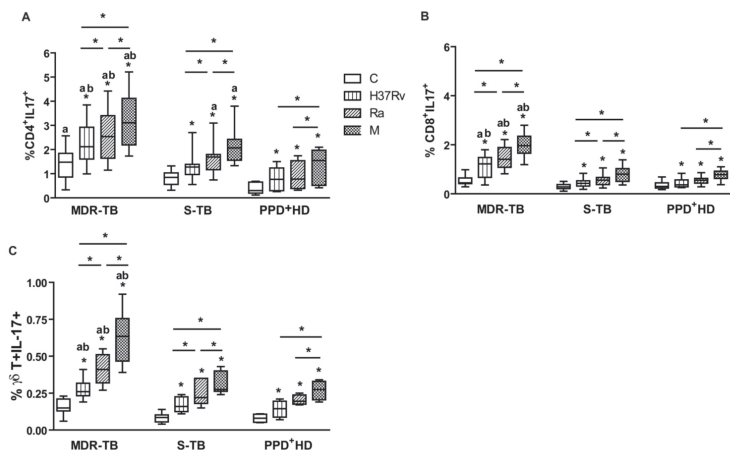


Figura 2: Las células Th17 fueron expandidas como resultado de la estimulación con las cepas MDR-*Mtb* (M y Ra). El porcentaje de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y $\gamma\delta$ ⁺ que expresan IL-17 se determinó por citometría de flujo (FACS) para los “gates” de cada subpoblación mencionada. Los resultados son expresados como (A) porcentaje de células CD4⁺IL-17⁺, (B) porcentaje de células CD8⁺IL-17⁺, and (C) porcentaje de células T $\gamma\delta$ ⁺IL-17⁺. * = P < 0.05 para diferencias entre cultivos estimulados con las distintas cepas de *Mtb* y el control no estimulado; a = P < 0.05 para diferencias encontradas entre pacientes con MDR-TB vs S-TB; b = P < 0.05 para pacientes MDR-TB o S-TB vs PPD+HD.

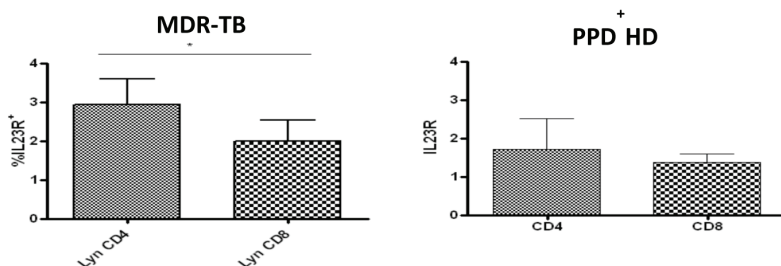


Figura 3: Gráfico representativo de la determinación de la expresión basal para el receptor de IL-23R en cultivos ex vivo de CMSP de paciente MDR-TB y PPD+HD para las subpoblaciones T CD4⁺ y CD8⁺

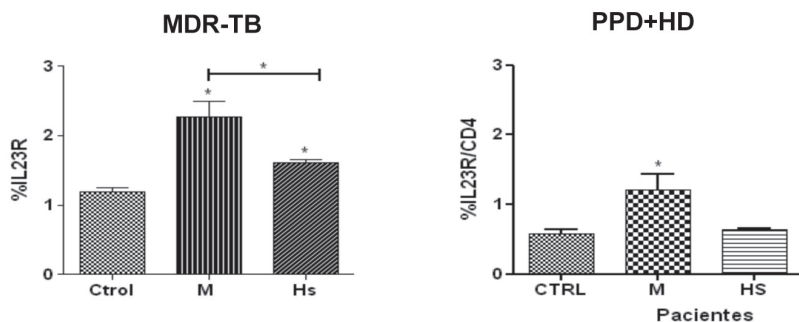


Figura 4: Expresión del receptor de IL23R en cultivos a 48 h estimulados con dos cepas diferentes de *Mtb* pertenecientes a la misma familia Haarlem. La determinación se ensayó sobre CMSP pacientes MDR-TB como también sobre individuos normales PPD+HD.

Habiendo observado la alta capacidad de las cepas M y Ra para inducir IL-17, quisimos determinar si se trataba de una característica de estas cepas MDR-*Mtb*, o si es compartido con cepas S-*Mtb* pertenecientes a la misma familia. A estos efectos, dos aislados clínicos sensibles fueron seleccionados, la cepa 10406 (Ls), un representante de la familia Latinoamericana-mediterránea relacionada con la cepa Ra, y 10475 (Hs), un representante de la familia Haarlem relacionada con la cepa M.

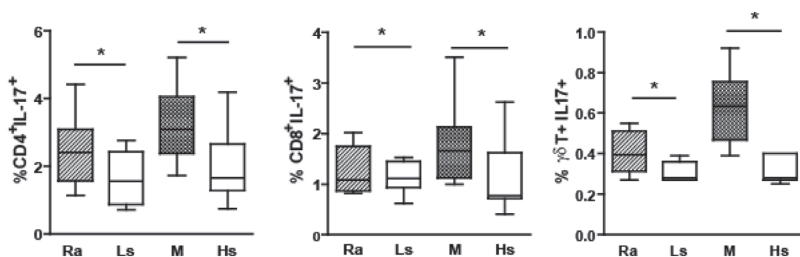


Figura 5: Expansión de células CD4⁺ IL-17⁺ inducida por diferentes cepas perteneciente a las familias Haarlem y Latinoamericano-Mediterraneo tanto sensibles como multirresistente a drogas.

El IFN γ controla la diferenciación de las células Th17 como así también un número considerable de células doble positivas llamada Th17-Th1, capaces de producir ambas citoquina, IL-17 e IFN γ , la cuales se encuentran en circulación (26). Con el fin de explorar la importancia de ésta subpoblación de células T doble positivas, se determinó la proporción de IL-17 e IFN γ , como también el porcentaje de células T IL-17⁺IFN γ ⁻, e IL-17⁺IFN γ ⁺ dentro de la población de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de paciente con TB y PPD+HD (Figura 6).

El porcentaje de células IL17⁺IFN γ ⁻ (Th17 “single”) fue mayor en los cultivos no estimulados para la población de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de paciente TB que en el de PPD+HD. Luego de la estimulación con las cepas de *Mtb* la proporción de células IL17⁺IFN γ ⁻ aumentó tanto en la población de linfocitos CD4⁺ como CD8⁺ procedentes de pacientes TB mientras que en PPD+HD esta proporción fue apenas aumentada para la población de linfocitos T CD8⁺ (no mostrado). Al observar la subpoblación Th17-Th1, detectamos que esta misma no presenta diferencias en cultivos no estimulados. Al detenernos sobre los cultivos estimulados con las distintas cepas de *Mtb*, visualizamos que la mayor expresión de IL-17 ocurrió con la estimulación de la cepa sensible H37Rv y la menor se halló con la estimulación con M (Figura 6).

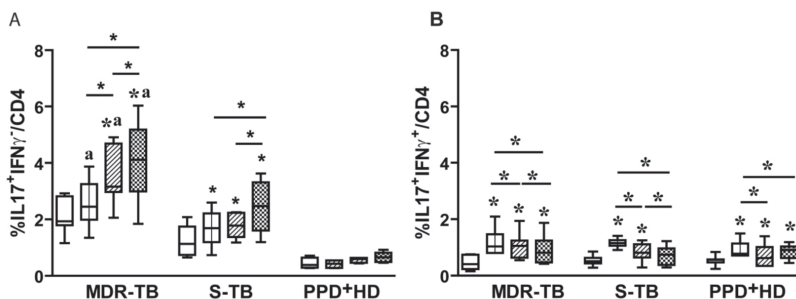


Figura 6: Expresión de IL-17 por las diferentes subpoblaciones pertenecientes al linaje Th17. A: Th17 “single”. B: Th17-Th1 “doble positivo”. Para explorar el comportamiento de ambas subpoblaciones determinamos la proporción de IL-17 e IFN γ mediante citometría de flujo. El porcentaje de células IL17⁺IFN γ ⁻ “single Th17” fue mayor en los pacientes TB (MDR-TB y S-TB) que en los individuos sanos PPD⁺ (PPD+HD).

En pacientes con MDR-TB evaluamos si la expansión de las poblaciones productoras de IL-17 como consecuencia de la estimulación con las diferen-

tes cepas de *Mtb*, correlacionaba con datos procedentes de la clínica de los pacientes como días de negativización en esputo y los días de tratamiento al momento del estudio. A través de la Figura 7 pudimos observar que a lo largo del tratamiento el porcentaje de células T CD4⁺IL-17⁺ y el de células T IL-17⁺IFN⁻ dentro de la subpoblación linfocitaria T CD4⁺ decrecieron. Además, visualizamos que cuantos menos días se empleen en alcanzar la negativización de bacilos en esputo mayor será el porcentaje de linfocitos IFN⁺. Este mismo comportamiento se evidenció para las subpoblaciones CD8⁺IL-17⁺ y CD8⁺IFN⁺ (Figura 7).

CONCLUSIONES

En este trabajo, hemos encontrado que las cepas MDR M y Ra son estímulos más fuertes en lo referente a expresión de IL-17 en las células T que las cepas sensibles pertenecientes a las mismas familias tanto pacientes con TB como en los PPD⁺HD. Los pacientes mostraron una mayor proporción de células T circulantes que expresan IL-17 la cual se asoció con altos niveles de IL-23R en las células T y con la presencia de bacilos en las muestras de esputo. Por otro lado también pudimos poner en evidencia que la cepa MDR M expande un número mayor de células T IL-17⁺ que la cepa MDR Ra y la cepa sensible H37Rv de individuos PPD⁺HD. Además, se observó que los aislados clínicos sensibles a drogas pertenecientes a las familias Haarlem y Latinoamericana-Mediterránea (Ls y Hs) no son capaces de generar expansión de células IL-17⁺ en individuos PPD⁺HD, pero a su vez generan una expansión de células IL-17⁺ menor que las cepas MDR en TB, sugiriendo variaciones de tipo fenotípicas a nivel de la pared celular y como consecuencia de esto último un reconocimiento a nivel de receptores de reconocimiento de patrones diferencial para *Mtb*.

También se encontró un aumento de células T IL-17⁺ en pacientes con TB, sobre todo en aquellos pacientes con MDR-TB. Ambas cepas MDR fueron mejores productoras de IL-17 que la cepa sensible H37Rv, y la cepa M fue la mayor inductora en células T CD4⁺, y en menor medida para las subpoblaciones T CD8⁺ y $\gamma\delta$ ⁺ de pacientes.

Asimismo es sabido que la IL-23 se requiere para el desarrollo de la respuesta Th17 dado que ratones deficientes en IL-23p19 son incapaces de mantener una adecuada respuesta Th17, aun después de la infección de *Mtb*. La IL-23 no es necesaria para la diferenciación inicial de las células productoras

de IL-17 sin embargo, su expresión es necesaria para sostener la producción de IL-17 (27,28).

Resta por comentar que a mayores nivel de células doble positiva IL-17⁺IFN γ ⁺ (pertenecientes al subpoblación Th17), menor es la proporción

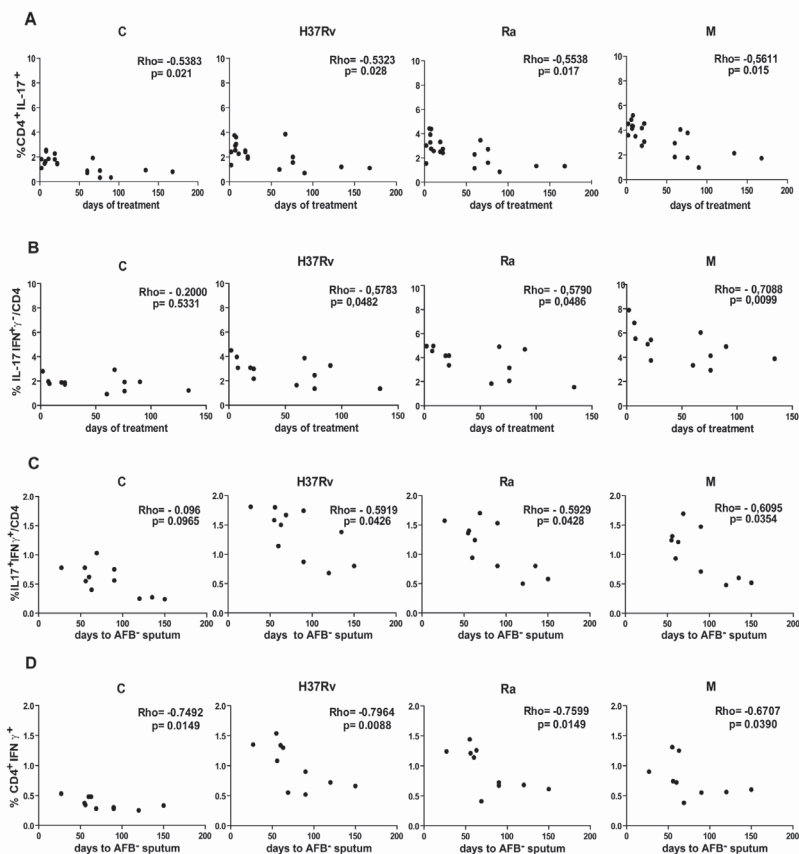


Figura 7: A. Correlación entre los días de tratamiento de la TB y el porcentaje de células T CD4⁺IL-17⁺. B. Correlación entre el porcentaje de células T IL-17⁺IFN γ ⁺ dentro de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ y los días de tratamiento. C. Correlación entre el porcentaje de células T IL-17⁺IFN γ ⁺ y los días de negativización. D. Correlación entre los días de negativización y el porcentaje de células CD4⁺IFN γ ⁺.

de células T IL17+IFN γ - "Th17 single" dentro de las poblaciones linfocitarias T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ de paciente con TB como así también en individuos sanos PPD+HD luego de la estimulación con *Mtb*. Sin embargo, las cepas mostraron diferencias en la expansión de células T dobles positivas IL-17+IFN γ $^{+}$. En éste sentido, la cepa H37Rv fue la mejor inductora in individuos sanos PPD+HD, lo cual es coincidente con datos bibliográficos (29).

En resumen, hemos observado que las cepas MDR M y Ra aumentan significativamente los niveles de células IL-17 $^{+}$ que las cepas de *Mtb* sensibles a drogas pertenecientes a las mismas familias. Cabe destacar que los pacientes con MDR-TB presentan el mayor número de células T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ dependiente para la respuesta Th17 las cuales serían independiente de las cepas, pero está estrechamente asociada a una alta carga bacilar persistente, lo que sugiere un papel inmunopatológico en MDR-TB.

ABSTRACT

The proinflammatory cytokine interleukin 17 (IL-17) plays an important role in immune responses but it is also associated with tissue-damaging inflammation. So, we evaluated the ability of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to induce IL-17 in tuberculosis (TB) patients and in healthy human tuberculin reactors (PPD+HD).

IL-17, interferon γ (IFN- γ), and interleukin 23 (IL-23) receptor expression were evaluated *ex vivo* and cultured peripheral blood mononuclear cells from TB and PPD+HD stimulated with irradiated clinical isolates from multidrug resistant (MDR) outbreaks M (Haarlem family) and Ra (Latin American-Mediterranean family), as well as drug-susceptible isolates belonging to the same families and laboratory strain H37Rv for 48 hours in T-cell subsets by flow cytometry.

We observed that MDR strains M and Ra are stronger IL-17 inducers than drug-susceptible *Mtb* strains of the Haarlem and Latin American-Mediterranean families. Moreover, MDR-TB patients shown the highest IL-17 expression which is independent on the strain, but IL-17 expression is dependent on CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells associates with persistently high antigen load.

IL-17-producing T cells could play an immunopathological role in MDR-TB promoting severe tissue damage, which may be associated with the low effectiveness of the second-line drugs employed in the treatment.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fenton, M.J. and M.W. Vermeulen 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun*, 64(3): 683-90.
2. Aita J, Barrera L, Reniero A, y col. 1996. *Medicina* (Buenos Aires) 56:48-5
3. Ritacco V, Di Lonardo M, Reniero A, et al. 1997. *J Infect Dis* 176:637-642.
4. Palmero D, Ritacco V, Ruano S, Ambroggi M, Cusmano L, Romano M, Bucci Z, Waisman J. 2005. *Int J Tuberc Lung Dis* 9:1168-70.
5. Palmero D y col E. *Emerg Infect Dis*. 9: 965-9.ç
6. Matteelli A, Migliori GB, Cirillo D, Centis R, Girard E, Raviglione M. *Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis: epidemiology and control. Expert Rev Anti Infect Ther* 2007;5:857-71.
7. Raviglione M, Gupta R, Dye Ch, Espinal MA. Communicable Diseases, Stop TB, World Health Organization, Geneva 27,Switzerland, 2001.
8. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage F, Gurney AL. *J. Biol. Chem.* 278; 1910.14, 2003.
9. Harrington LE y col. *Nat. Immunol.* 6: 1123-1132, 2005.
10. Wilson NJ y col. *Nat Immunol.* 8: 950-957, 2007.
11. Annunziato F y col J. *Exp Immunol* 204 1849-1861, 2007
12. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med* 2005;201:233-40.
13. Antonyamy MA, Fanslow WC, Fu F, et al. *Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. J Immunol* 1999;162:577-84.
14. Torrado E, Robinson RT, Cooper M. *Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. Trends Immunol* 2011;32:66-72K
15. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. *The phenotype of uman Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. Int Immunol* 2008;20:1361-8
16. Kaufmann SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol.* 2005 660-7. Epub 2005.
17. Faurschou M, Borregaard N. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5:1317-27.
18. Babior BM. 1984. Oxidants from phagocytes: Agents of defense and destruction. *Blood* 64:959-966.
19. World Health Organization. 1997. Global Tuberculosis Programme and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/TB/96.216. Geneva: The Organization.
20. Sassetti C.M, Boyd D, and Rubin E.J. 2001. Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:12712-12717.
21. Geffner L, Yokobori N, Basile J, Schierloh P, Balboa L, Romero MM, Ritacco V, Vescovo M, González Montaner P, Lopez B, Barrera L, Alemán M, Abatte E, Sasiain MC, de la Barrera S. 2009. Patients with multidrug-resistant tubercu-

- losis display impaired Th1 responses and enhanced regulatory T-cell levels in response to an outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* M and Ra strains. *Infect Immun*. 77(11):5025-34.
22. Kaufmann SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol*. 26:660, 2005
 23. Alemán M, de la Barrera S, Schierloh P, Yokobori N, Baldini M, Musella R, Abbate E, Sasiain M. 2007. Spontaneous or *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptotic neutrophils exert opposite effects on the dendritic cell-mediated immune response. *Eur J Immunol*. 37(6):1524-37.
 24. Balboa L, Romero MM, Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, Basile JI, Musella RM, Abbate E, de la Barrera S, Sasiain MC, Alemán M. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile. *Immunol Cell Biol*.
 25. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 2008;205:1903-16.
 26. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849-61.
 27. Khader SA, Pearl JE, Sakamoto K, et al. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* 2005;175:788-95.
 28. Paidipally P, Periasamy S, Barnes PF, et al. NKG2D-dependent IL-17 production by human T cells in response to an intracellular pathogen. *J Immunol* 2009;183:1940-5.
 29. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849-61.

ANÁLISIS DE LOS GENES FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-ALFA (TNF- α) E INTERFERÓN-GAMMA (IFN- α) EN PACIENTES CON SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS (SMD) Y ANEMIA APLÁSICA (AA): PRESENCIA DE POLIMORFISMOS Y NIVELES DE EXPRESIÓN

Belli, Carolina¹; Ferri, Cristian¹; Gori, María Soledad²; Salamone, Gabriela² y Bestach, Yesica¹.

¹Laboratorio de Genética Hematológica; ²Laboratorio de Células Presentadoras de Antígenos y Respuesta Inflamatoria. Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET/ Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires. Argentina.

INTRODUCCIÓN

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) y la Anemia Aplásica (AA) son Síndromes de Falla Medular adquirida (SFMA). Los SMD constituyen un grupo heterogéneo de alteraciones hematológicas caracterizadas por la presencia de citopenia(s) periférica y una médula ósea (MO) normo-hipercelular con alteraciones displásicas y riesgo variable de evolución a Leucemia Mieloi-de Aguda (LMA)¹⁻³. Mientras que, la AA es una insuficiencia medular global de tipo cuantitativo caracterizada por hipo-acelularidad medular, fracaso hematopoyético y pancitopenia periférica⁴. Sin embargo, un 5-15% de los pacientes con SMD presentan MO hipocelulares y hallazgos citogenéticos que hacen difícil el diagnóstico diferencial entre los SMD hipoplásicos y la AA⁵⁻⁶. Además, se estima que alrededor del 15% de los pacientes con AA desarrollan una enfermedad clonal dentro de los 5 años del diagnóstico, entre las que se encuentran los SMD/LMA⁷.

Las opciones actuales de tratamiento para los pacientes con SMD se dividen según los factores de riesgo individuales, en baja o alta intensidad⁸. Las terapias inmunosupresoras (TIS) se encontrarían dentro de las opciones de baja intensidad y han demostrado ser efectivas en pacientes que presentan riesgo bajo, trisomía 8, presencia del antígeno HLA-DR15 (DR2) y MO hipocelular, entre otros factores^{5,9}. Las opciones terapéuticas para los pacientes con AA incluyen las TIS [globulina antitímocítica (GAT) y ciclosporina] y/o el trasplante de MO⁴. Las características clínicas antes mencionadas y las opciones terapéuticas en estos pacientes, evidencian una zona de intersección clínica entre ambas patologías hematológicas.

La participación de mecanismos inmunes ha sido implicada como posible vía pato-fisiológica en estos SFMA, evidenciado clínicamente por la respuesta de los pacientes a las TIS^{4,10}. Las citoquinas son mediadores inmunes que juegan un rol importante en la regulación de la hematopoyesis, en donde el balance entre la acción de factores estimulantes/mielosupresores es fundamental para la óptima producción de los diferentes linajes hematopoyéticos¹⁰⁻¹⁶. Los pacientes con SMD y AA presentan un aumento de células T-efectoras con un perfil citotóxico e incrementada producción de citoquinas típicas de la respuesta inmune celular T-helper 1, especialmente las citoquinas pro-inflamatorias Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) e Interferón- γ (IFN- γ), entre otras^{10,17}. Los niveles séricos de estas citoquinas se encuentran elevados en pacientes con SMD, las cuales están involucradas en la supresión de la hematopoyesis y se relacionan con el proceso apoptótico característico de las fases tempranas de esta patología [10, 14]. También se han encontrado niveles aumentados de estas citoquinas en plasma y células de MO en pacientes con AA¹⁸.

La causa por la cual las células T están activadas en estos SFMA aún no es clara. La susceptibilidad a desórdenes autoinmunes se asocia con genes altamente polimórficos del sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*). El HLA-DR15 (DR2) es más frecuente en los pacientes con SMD y AA, cuya presencia predice respuesta a TIS⁹. Además, la presencia de numerosos polimorfismos en genes de citoquinas, implicados en el control de la producción de estas moléculas, también se relaciona con susceptibilidad. Las variantes alélicas +874T, CA12 y -308A de los polimorfismos +874A/T y 1349(CA)_n del gen IFN- γ y -308G/A del TNF- α , asociadas con alta producción de las citoquinas respectivas, se observan con mayor frecuencia en pacientes con SFMA¹⁹⁻²⁴.

Por lo tanto, los objetivos del proyecto fueron analizar variantes de secuencia de los genes que codifican para las citoquinas TNF- α e IFN- γ en pacientes con SMD y AA, relacionar estos hallazgos con los niveles de expresión de estos genes y, finalmente, asociar los resultados obtenidos con las características clínicas de los pacientes y la respuesta a tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron 134 pacientes con SMD (9 SMD hipoplásicos) y 47 pacientes con AA, de manera retrospectiva (marzo 1987-marzo 2013), pro-

venientes de diferentes instituciones de salud. Fueron incluidos pacientes con diagnóstico confirmado de SMD *de novo*, sin antecedentes documentados de radio- o quimioterapia, categorizados según la clasificación Franco-Americano-Británica¹ y según los criterios de la Organización Mundial de la Salud²⁵. Los pacientes con AA fueron diagnosticados de acuerdo al *International Agranulocytosis and Aplastic Anaemia Study Group*²⁶ y clasificados, en cuanto a la severidad de la enfermedad, según los criterios de *Camitta y col*, 1975²⁷.

Extracción de ácidos nucleicos

El ADN genómico y el ARN de las muestras fue obtenido a partir de células nucleadas de MO y/o sangre periférica (SP). La extracción de ADN fue realizada mediante el método de extracción de fenol-cloroformo, mientras que el ARN se extrae mediante TRIZOL (*Invitrogen*, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Estudio de polimorfismos

- SNP -308G/A del gen TNF- α :

Este SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) se estudia mediante la técnica PCR-RFLP (*PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Tabla 1). Los productos de amplificación son sometidos a una digestión con la enzima de restricción *Nco*I. Luego, los digestos se resuelven mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (29:1) al 12% no desnaturalizante y las bandas son visualizadas por tinción argéntica²⁸.

- Polimorfismo de repeticiones dinucleotídicas 1349(CA)*n* del gen IFN- γ :

Para el estudio de este polimorfismo se realiza una amplificación por PCR (Tabla 1). Luego, los productos de amplificación son separados en un gel de poliacrilamida (19:1) al 10% no desnaturalizante y las bandas visualizadas mediante tinción argéntica²³.

- SNP +874A/T del gen IFN- γ :

Este SNP se estudia mediante PCR-alelo específica (Tabla 1). Los productos amplificados son visualizados en un gel de agarosa al 2%, mediante tinción con bromuro de etidio²⁴.

Análisis del nivel de expresión

- Expresión plasmática:

Los niveles plasmáticos de las citoquinas TNF- α e IFN- γ fueron determinados mediante un ensayo de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) utilizando el kit *BD Opt EIA™* (*BD Biosciences*, San Diego, USA).

- Expresión génica:

El nivel de expresión de los genes se realiza a partir de ARN cuantificado por PCR en Tiempo Real. El ARN se retro-transcribe a ADNc y luego se amplifica utilizando un termociclador *Rotor Gene Q* (*Qiagen*). La cuantificación se realizó utilizando el método de Mezcla Real (*Biodynamics*, Argentina). Se seleccionó como gen control Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), para la posterior cuantificación de los genes relativa a este gen control (Tabla 1). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen IFN- γ fueron diseñados utilizando el programa *PrimerSelect*.

Genes	Oligonucleótidos (secuencia 5' → 3')
TNF-α SNP -308 G/A	<i>foward</i> : AGGCAATAGGTTTGGAGGGCCAT <i>reverse</i> : CCTCCCTGCTCCGATTCCG
IFN-γ polimorfismo 1349 (CA)<i>n</i>	<i>foward</i> : GCTGTCATAATAATATTCAGAC <i>reverse</i> : CGAGCTTTAAAAGATAGTTCC
IFN-γ SNP +874 A/T	<i>foward A</i> : TTCTTACAACACAAAATCAAATCA <i>foward T</i> : TTCTTACAACACAAAATCAAATCT <i>reverse</i> : AAGATAGTTCCAAACATGTGCGAG
IFN-γ expresión génica	<i>foward</i> : GACCAGAGCATCCAAAAGAGTG <i>reverse</i> : TGCAGGCAGGACAACCATTA
GAPDH expresión génica	<i>foward</i> : CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT <i>reverse</i> : AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC

Análisis estadístico

Las diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas fueron analizadas mediante el Test Exacto de *Fisher*. Las variables fueron comparadas utilizando el Test de *Mann-Whitney* o Test de *t*. El nivel de significancia estadística fue determinado en 0,05. Los datos fueron analizados utilizando los

programas estadísticos *GraphPad Prism* versión 5.00 (*GraphPad Software*, San Diego, USA) y *SPSS* versión 17.00 (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, USA).

RESULTADOS

Pacientes

Se estudió una población de 134 pacientes con SMD la cual presentó relación de sexos M/F: 72/62 y las siguientes características al diagnóstico: mediana (mna.) de edad: 65 años; mna. nivel de hemoglobina (Hb): 9,6g/dL; mna. recuento de neutrófilos (N): 1794/ μ L y mna. recuento de plaquetas (Pq): 126000/ μ L. Con respecto a la AA, se estudiaron 47 pacientes cuyas características fueron: relación de sexos M/F: 23/24; mna. de edad: 23,5 años; mna. nivel de Hb: 7,1g/dL; mna. recuento de N: 603/ μ L; mna. recuento de Pq: 10000/ μ L y mna. reticulocitos: 0,5%, al diagnóstico. Como población control se estudiaron 121 muestras de individuos sanos.

Estudio de polimorfismos

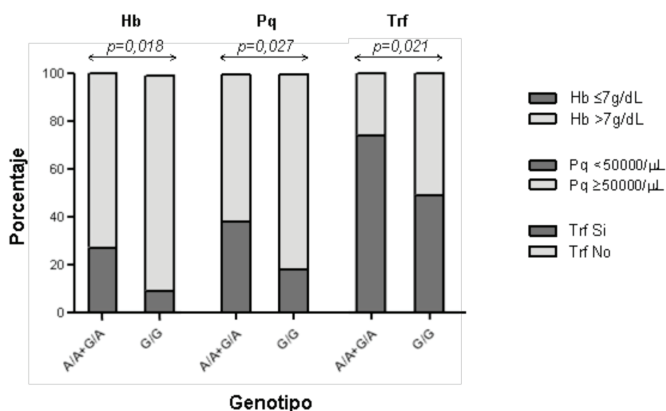
- SNP -308G/A del gen TNF- α :

Los resultados obtenidos del estudio de este SNP muestran que la frecuencia del genotipo asociado a mayor producción (G/A+A/A) se encuentra duplicada en los SMD respecto a la población control ($p=0,0196$, *Odds ratio* -OR: 2,163), siendo tres veces mayor que la observada en AA ($p=0,0395$, OR: 2,970). No se encontraron diferencias significativas al comparar estas frecuencias genotípicas entre la población de AA vs. la población control (Tabla 2).

En pacientes con SMD, la presencia del alelo -308A se asoció con niveles menores de Hb (8,9 vs. 9,8g/dL; $p=0,043$), recuentos más bajos de Pq (113375 vs. 156481/ μ L; $p=0,049$) y menor edad (57 vs. 65 años; $p=0,020$), al diagnóstico. Además, estos pacientes mostraron un riesgo incrementado de presentar al diagnóstico niveles de Hb menores a 7g/dL (27 vs. 9%; $p=0,0180$, OR: 3,600) y recuentos de Pq menores a 50000/ μ L (38 vs. 17%; $p=0,0274$, OR: 2,824), además de presentar mayor necesidad de requerir transfusiones (74 vs. 49%; $p=0,0206$, OR: 3,006) durante el curso de la enfermedad (Figura 1). Estos resultados muestran que la presencia del alelo -308A se asocia con citopenias mas profusas en los pacientes con SMD.

Tabla 2: Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -308G/A del gen TNF- α .

	Pacientes				Controles (n=121)		SMD vs. AA: <i>p</i> = 0,0395 SMD vs. Controles: <i>p</i> = 0,0196 AA vs. Controles: <i>p</i> = 0,6216
	SMD (n=134)		AA (n=47)				
Genotipos	n	%	n	%	n	%	
G/G	99	73,9	42	89,4	104	86,0	
G/A+A/A	35	26,1	5	10,6	17	14,0	
Alelos	2n	%	2n	%	2n	%	SMD vs. AA: <i>p</i> = 0,0254 SMD vs. Controles: <i>p</i> = 0,0339 AA vs. Controles: <i>p</i> = 0,4882
G	231	86,2	89	94,7	223	92,1	
A	37	13,8	5	5,3	19	7,9	

**Figura 1:** SNP -308G/A del gen TNF- α y asociación con parámetros clínicos en SMD.

Dentro de los SMD, 4 pacientes fueron clasificados como Síndrome 5q-, 2 de los cuales presentaron el genotipo G/A. Dado que este síndrome se caracteriza por el elevado recuento de Pq, estos pacientes fueron excluidos al analizar este parámetro (media de los pacientes: 387250/mL).

Con respecto a los pacientes con AA no se encontraron asociaciones entre la presencia del alelo -308A y los parámetros clínicos analizados al diagnóstico.

- Polimorfismo de repeticiones dinucleotídicas 1349(CA)_n del gen IFN- γ :

En este estudio se describieron 7 alelos diferentes encontrados: CA11, CA12, CA13, CA14, CA15, CA16 y CA17. La presencia en el genotipo del alelo de interés CA12 se indica como CA12+ y la presencia de cualquiera de los otros alelos se indica como CA12-. No se encontraron diferencias significativas al comparar las frecuencias genotípicas de la población de SMD y de AA vs. los controles ($p=0,3761$ y $p=0,3897$, respectivamente), así como tampoco al comparar ambas poblaciones de pacientes ($p=0,8636$). En cuanto a las frecuencias alélicas tampoco se encontraron diferencias significativas (Tabla 3).

	Pacientes				Controles (n=121)		
	SMD (n=134)		AA (n=47)				
Genotipos	n	%	n	%	n	%	SMD vs. AA: $p= 0,8636$ SMD vs. Controles: $p= 0,3761$ AA vs. Controles: $p= 0,3897$
CA12+/CA12- + CA12+/CA12+	80	59,7	29	61,7	65	53,7	
CA12-/CA12-	54	40,3	18	38,3	56	46,3	
Alelos	2n	%	2n	%	2n	%	SMD vs. AA: $p= 0,8057$ SMD vs. Controles: $p= 0,5789$ AA vs. Controles: $p= 0,5261$
CA12	99	36,9	36	38,3	83	34,3	
CA(11,13,14,15,16,17)	169	63,1	58	61,7	159	65,7	

Tabla 3: Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo de repetición 1349(CA)_n del gen IFN- γ .

Con respecto a los parámetros clínicos, se encontró que los pacientes con SMD homocigotas para el alelo CA12 presentaron menores recuentos de neutrófilos (1388 vs. 2796/ μ L; $p=0,021$), al diagnóstico. No se encontraron asociaciones con parámetros clínicos en los pacientes con AA.

- SNP +874A/T del IFN- γ :

Se estudió una población de 110 pacientes (71 SMD y 39 AA) y una población control de 113 muestras. Las frecuencias genotípicas halladas fueron: 0,45 (A/A), 0,39 (A/T) y 0,16 (T/T) para los pacientes vs. 0,46, 0,40 y 0,14 para los controles, respectivamente, no encontrándose diferencias significativas ($p=0,9634$). Con respecto a las frecuencias alélicas halladas [0,65 (A) y 0,35 (T) para los pacientes vs. 0,66 y 0,34 para la población control, respectivamente] tampoco se encontraron diferencias significativas ($p=0,8355$).

Análisis de expresión:

- Expresión plasmática:

Se analizaron los niveles plasmáticos de las citoquinas TNF- α e IFN- γ en muestras de SP de 22 pacientes (16 AA y 6 SMD) y 9 individuos controles. Los resultados arrojaron una tendencia en estos pacientes a niveles plasmáticos incrementados de TNF- α respecto de la población control (31,35 vs. 28,71 pg/ml; $p=0,086$). Con respecto a los niveles de IFN- γ , las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas (18,34 vs. 13,33 pg/ml; $p=0,890$).

- Expresión génica:

Para el estudio de los niveles de expresión, se analizó el gen IFN- γ en 21 muestras de pacientes (13 AA y 8 SMD) y 13 muestras de individuos controles. No se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de expresión en este grupo de pacientes vs. los controles (mna. IFN- γ /GAPDH: 0,01353 vs. 0,01652; $p=0,9153$).

CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

Los SMD y la AA son SFM adquirida en donde la participación de mecanismos inmunes ha sido implicada como posible vía pato-fisiológica^{4,10}. Las citoquinas juegan un rol predominante en la respuesta inflamatoria y en la regulación de la hematopoyesis al modular el microambiente medular. La disregulación de citoquinas ha sido implicada en la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes y es considerada como uno de los mecanismos de interés para el desarrollo de TIS²⁹⁻³⁰.

El estudio del SNP -308G/A del gen TNF- α mostró que la población total de pacientes con SFMA (SMD y AA, $n=181$) presentaba una tendencia hacia una mayor frecuencia de genotipos asociados a alta producción de esta citoquina, respecto a la población control ($p=0,0986$). Estos resultados se relacionan con los observados al analizar el nivel en plasma del TNF- α , aunque el número de pacientes estudiados es reducido. Si comparamos las frecuencias genotípicas en cada patología en particular pudimos observar que el genotipo asociado a alta expresión de esta citoquina se encuentra tres veces incrementado en los pacientes con SMD respecto a la población de AA, y dos veces más representado respecto a la población control. Además,

la presencia del alelo -308A se asoció con menor edad, mayor grado de anemia y trombocitopenia al diagnóstico, y a un incremento en la necesidad de requerir soporte transfusional durante la enfermedad. Estos resultados confirman nuestros hallazgos previos obtenidos con casuísticas menores³¹⁻³³.

Con respecto al gen IFN- γ , al analizar la población total de pacientes no se encontraron diferencias significativas en cuanto a las frecuencias genotípicas y alélicas, tanto del polimorfismo de repetición 1349(CA)_n como del SNP +876A/T, respecto de los controles. Tampoco se observaron diferencias en cuanto a los niveles de expresión de esta citoquina, ya sea a nivel plasmático como a nivel de expresión génica, en esta población reducida de pacientes. Sin embargo, al analizar la población de SMD, los pacientes con genotipo CA12/CA12 asociado a alta expresión de IFN- γ presentaron recuentos menores de neutrófilos, infiriendo una posible implicancia clínica de este polimorfismo en la patología.

Las TIS son una estrategia terapéutica clave para pacientes con SFMA mediada por mecanismos inmunes. La disminución de linfocitos activados mediante el tratamiento con GAT, lo cual generaría una disminución en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, mejoraría la hematopoyesis y el nivel de citopenias de estos pacientes [34]. Los pacientes con AA (N=37) que presentaron al menos una variante alélica asociada a mayor producción de citoquinas [-308A TNF- α y/o 1349(CA12) IFN- γ] mostraron mayores tasas de respuesta global al tratamiento (65 vs. 40%), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,2600$).

Como conclusión, observamos una posible implicancia clínica de la citoquinas estudiadas principalmente en los SMD. Agentes anti-TNF- α como el receptor recombinante soluble (*Etanercept*) o el anticuerpo monoclonal quimérico (cA2) han mostrado grados variables en la mejoría de las citopenias en estos pacientes, sin embargo estos ensayos clínicos no tuvieron en cuenta el genotipo de los pacientes^{29,34-36}.

La sobre-expresión de estas citoquinas podría promover un estado pro-inflamatorio basal, en donde el microambiente medular cooperaría con defectos intrínsecos de los progenitores hematopoyéticos profundizando la severidad de las citopenias características de estos síndromes. La posibilidad de definir susceptibilidad en relación a la presencia de estos polimorfismos contribuiría a mejorar posibles estrategias terapéuticas, ya que estos pacientes se verían beneficiados con TIS.

RESUMEN

Los SMD y la AA son Síndromes de Falla Medular Adquirida (SFMA), los cuales comparten una zona de intersección clínica. Estos pacientes presentan un aumento de células T-efectoras con perfil citotóxico asociado con la producción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IFN- γ , relacionado con la supresión de la hematopoyesis. Nuestro objetivo fue estudiar los polimorfismos +874A/T y 1349(CA)_n del gen IFN- γ y el -308G/A del gen TNF- α (asociados a su expresión diferencial) en pacientes con SFMA, medir los niveles de expresión de estas citoquinas y asociar estos resultados con parámetros clínicos.

Se estudiaron 181 pacientes con SFMA (134 con SMD y 47 con AA). El estudio del polimorfismo -308G/A del gen TNF- α mostró que la frecuencia del genotipo asociado a su mayor expresión (G/A+A/A) se encuentra tres veces incrementado en los pacientes con SMD *versus* AA y dos veces más representado *versus* controles sanos (N=121). La presencia del alelo -308A se asoció con menor edad, mayor grado de anemia y trombocitopenia, al diagnóstico, y mayor necesidad de requerir transfusiones durante el seguimiento. Si bien no se encontraron diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados en IFN- γ , se encontró que los pacientes con SMD CA12/CA12 presentaron menores recuentos de neutrófilos al diagnóstico.

Aunque no se encontraron diferencias en la presencia de los polimorfismos estudiados en la población de AA, los pacientes con al menos una variante asociada a mayor producción en su genotipo responderían mejor al tratamiento con terapias inmunosupresoras.

Con respecto a los resultados en la población total de pacientes con SFMA, sólo la frecuencia genotípica para el polimorfismo -308G/A mostró una tendencia de diferir estadísticamente de la población control. Estos resultados se relacionan con la tendencia observada de una mayor expresión de TNF- α plasmático en los pacientes con SFMA *versus* controles. Mientras que, para el IFN- γ no se observaron diferencias significativas ni a nivel plasmático ni de expresión génica.

Como conclusión, observamos una posible implicancia clínica principalmente de estas citoquinas en la fisiopatogenia de los SFMA, sobre todo del TNF- α en los pacientes con SMD.

ABSTRACT

MDS and AA are acquired bone marrow failure syndromes (ABMFS), and they share overlapping clinical and pathological features. These patients show increased percentage of effector T cells with cytotoxic profile expressing pro-inflammatory cytokines, especially TNF- α and IFN- γ , which contribute to their hematopoietic failure. The aim of this work was to study polymorphisms associated with differential cytokine expression [+874A/T and 1349(CA)n in IFN- γ gene, and the -308G/A TNF- α] in ABMFS patients. In addition, to analyze expression levels of these cytokines and to associate the obtained results with clinical parameters.

We studied 181 ABMFS patients (134 MDS and 47 AA). Regarding the -308G/A TNF- α polymorphism, we found that the high producing A/A+G/A genotype was 3-fold overrepresented in MDS population as compared with AA, and 2-fold with respect to controls (N=121). The presence of the high expressing -308A allele was associated with younger age, lower hemoglobin level and reduced platelets counts at diagnosis, and higher transfusion requirement during the follow up. Even though IFN- γ polymorphisms did not show significantly differences regarding genotypic and allelic frequencies, MDS homozygote CA12/CA12 patients showed reduced neutrophils counts at diagnosis.

Although neither TNF- α nor IFN- γ polymorphism showed statistical significances in AA patients as compared with normal subject population, our findings suggest that AA patients bearing at least one high expressing variant would be better responders to immunosuppressive treatment.

Regarding the overall population studies, only the genotypic frequency for -308G/A polymorphism showed a tendency for a statistical significance as compared with normal subject. Consistently, ABMFS patients showed a trend to present higher plasmatic level of TNF- α compared with controls and no differences were observed neither respecting the plasmatic levels of IFN- γ nor regarding its mRNA expression, though a reduced population was studied.

In conclusion, our results suggest a possible clinical association for these cytokines in the pathogenesis of the ABMFS, mainly implicating TNF- α in MDS patients.

REFERENCIAS

1. Bennett J y col. Proposals for the classification of the myelodysplastic Syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:189-99.
2. Vardiman J y col. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms (Review). *Blood* 2002;100:2292-302.
3. Tefferi A, Vardiman J. Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 2009;361:1872-85.
4. Young N y col. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood* 2006;108:2509-9.
5. Calado R. Immunologic Aspects of Hypoplastic Myelodysplastic Syndrome. *Semin Oncol* 2011;38:667-72.
6. Konoplev S y col. Therapy may unmask hypoplastic myelodysplastic syndrome that mimics aplastic anemia. *Cancer* 2007;110:1520-6.
7. Maciejewski J y col. Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia. *Blood* 2002;99:3129-35.
8. Stone RM. How I treat patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 2009;113(25):6296-303.
9. Sauntharajah Y y col. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002;100:1570-4.
10. Chamuleau M y col. Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2009;94:496-506.
11. Marcondes A y col. Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:2865-70.
12. Gersuk G y col. A role for tumor necrosis factor- α , Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1998;103:176-88.
13. Navas T y col. Inhibition of p38 α MAPK disrupts the pathological loop of proinflammatory factor production in the Myelodysplastic Syndrome bone marrow microenvironment. *Leuk Lymphoma* 2008;49:1963-75.
14. Mundle S y col. Correlation of tumor necrosis factor α (TNF α) with high caspase 3-like activity in myelodysplastic syndromes. *Cancer Lett* 1999;140:201-7.
15. Deeg H y col. Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 2000;37:405-14.
16. Stifter G y col. Over-expression of tumor necrosis factor- α in bone marrow biopsies from patients with myelodysplastic syndromes: relationship to anemia and prognosis. *Eur J Haematol* 2005;75:485-91.
17. Young N. Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired aplastic anemia. *Semin Hematol* 2000;37:3-14.
18. Dubey S y col. Expression of interferon- γ and tumor necrosis factor- α in bone marrow T cells and their levels in bone marrow plasma in patients with aplastic anemia. *Ann Hematol* 2005;84:572-7.

19. Kroeger K y col. The -308 Tumor Necrosis Factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391-9.
20. Serio B y col. Impact of immunogenetic polymorphisms in bone marrow failure syndromes. *Mini Rev Med Chem* 2011;11:544-52.
21. Pravica V y col. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN γ gene: Absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN γ production. *Hum Immunol* 2000;61:863-6.
22. Peng J y col. The TNF2 allele is a risk factor to severe aplastic anemia independent of HLA-DR. *Hum Immunol* 2003;64:896-901.
23. Dufour C y col. Homozygosis for¹² CA repeats in the first intron of the human IFN-gamma gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. *Br J Haematol* 2004;126:682-5.
24. Gidvani V y col. Cytokine gene polymorphisms in acquired bone marrow failure. *Am J Hematol* 2007;82:721-4.
25. Harris N y col. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.* 1999;17:3835-49.
26. International Agranulocytosis and Aplastic Anaemia Study. Incidence of aplastic anaemia: relevance of diagnosis criteria. *Blood* 1987;70:1718-21.
27. Camitta B y col. Selection of patients for bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. *Blood* 1975;45:355-63.
28. Wilson A y col. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992;1:353.
29. Maciejewski J y col. A pilot study of the recombinant soluble human tumour necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein in patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2002;117:119-26.
30. Rusten L, Jacobsen S. Tumor Necrosis Factor (TNF)- α Directly Inhibits Human Erythropoiesis In Vitro: Role of p55 and p75 TNF Receptors. *Blood* 1995;85:889-996.
31. Belli C y col. The presence of -308A TNF α is associated with anemia and thrombocytopenia in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood Cells Mol Dis* 2011;47(4):255-8.
32. Belli C y col. La presencia del alelo -308 A del TNF α se asocia con anemia y plaquetopenia en pacientes con Síndromes Mielodisplásicos. *Hematología* 2012;16:147-53.
33. Bestach Y y col. Libro: "Tumor Necrosis Factor: Structure, Enzyme Regulation and Role in Health and Disease". Capítulo: "The presence of -308A TNF allele is associated with clinical parameters of Myelodysplastic Syndromes". Nova Biomedical Books, Inc. New York (En prensa).
34. Risitano A. Immunosuppressive therapies in the management of immune-mediated marrow failures in adults: where we stand and where we are going. *British Journal of Haematology* 2010;152:127-40.
35. Boula A y col. Effect of cA2 Anti-Tumor Necrosis Factor-A Antibody Therapy on

Hematopoiesis of Patients with Myelodysplastic Syndromes. Clin Cancer Res 2006;12:3099-108.

36. Scott B y col. Anti-thymocyte Globulin plus Etanercept as Therapy for Myelodysplastic Syndromes (MDS): a Phase II Study. Br J Haematol 2010;149:706-10.

ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA OBESIDAD Y EL ESTRÉS CRÓNICO EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA EN HUMANOS.

Dra. Gabriela Alicia Berg, Dra. Halina Grosman, Dra. Bibiana Fabre, Dr. Miguel López, Prof. Dr. Edgardo Becher

Dto. Bioquímica Clínica, Facultad Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas "José de San Martín", U.B.A.

RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es en la actualidad la tercera causa de muerte oncológica en el varón. La obesidad, principalmente abdominal (OA), se asocia a distintas patologías crónicas como enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico (SM), diabetes y algunos tipos de cáncer hormono-dependientes. En OA aumenta la producción de hormonas y citoquinas por el adipocito, con efectos controversiales en el desarrollo del CaP. Sin embargo, no se ha dilucidado si estas adipocitoquinas en el CaP actúan directamente o a través de otras hormonas. Paralelamente, el papel de factores psicosociales en el desarrollo de patologías crónicas como la obesidad, el SM y el cáncer es discutido. Esta asociación estaría mediada por la respuesta alterada al estrés crónico del eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal (HHA), con secreción elevada de cortisol, el cual actúa sobre receptores del tejido adiposo estimulando la expresión del gen responsable de la síntesis de leptina e inhibiendo al gen responsable de la síntesis de adiponectina. Otras citoquinas pro-inflamatorias liberadas por el tejido adiposo (IL-1, IL-6, TNF- α) estimularían la secreción de CRH o ACTH resultando en un incremento de cortisol, pudiendo ser el nexo entre estrés y adiposidad. Varias líneas de evidencia sugieren que los factores psicológicos pueden influenciar la progresión y el pronóstico en algunos tumores. Un mecanismo posible que liga al estrés con la progresión de tumores es a través de la intermediación de citoquinas pro-inflamatorias. No hay estudios específicos del efecto del estrés crónico sobre la prevalencia y severidad del CaP. El eje HHA a través del cortisol sería responsable del aumento del riesgo de SM y CaP, otros mediadores como la leptina y las citoquinas también participan de los mecanismos involucrados.

ABSTRACT

At present, prostate cancer (PCa) is the third leading cause of death from cancer in men. Obesity, in special abdominal obesity (AO), is frequently associated with different chronic diseases like cardiovascular disease, metabolic syndrome (MS), diabetes and also some kind of hormone-dependent cancers. In AO, hormonal and cytokines production by adipocytes is increased, with controversial effects on PCa development. However, it has not been established if these adipocytokines exert their effects on PCa directly or through indirect mechanisms that involve other hormones. As well, the role of psychosocial factors in the development of chronic diseases such as obesity, MS and cancer is controversial. This association should be mediated by an altered response of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis to stress, with an elevated cortisol secretion, which in turn acts on specific adipose tissue receptors, stimulating leptin gene expression and inhibiting adiponectin synthesis gene. Other pro-inflammatory cytokines released by adipose tissue (IL-1, IL-6, TNF- α) should stimulate CRH or ACTH secretion, which in turn results in higher cortisol levels; in this way, these cytokines could be a link between stress and adiposity. It is suggested that psychological factors can influence progression and prognosis of some tumors. A potential mechanism that links stress with tumors progression is that exerted through pro-inflammatory cytokines. There are no specific studies about the effects of chronic stress on PCa prevalence and severity.

The HPA axis through cortisol would be responsible for the increased risk of MS and PCa, other mediators such as leptin and cytokines are also involved in the mechanisms.

INSULINO-RESISTENCIA E INFLAMACION. FACTORES DE RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Bonneau, Graciela; Pedrozo, Williams

Laboratorio Central- Hospital Dr. Ramón Madariaga - Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales-Universidad Nacional de Misiones-Posadas-Misiones

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la primera causa de muerte en Misiones y Argentina, la aterosclerosis es su principal responsable y en la actualidad es concebida como un proceso inflamatorio crónico en el cual la disfunción endotelial juega un papel crucial, donde la insulino-resistencia (IR) promueve su desarrollo. Nos propusimos con una población urbana del interior del país, representada por empleados de dos hospitales públicos de la provincia de Misiones, conocer la prevalencia de IR y su relación con factores de riesgo para ECV como presión arterial, obesidad general y abdominal. Además, establecer la relación entre niveles circulantes de marcadores de inflamación (PCRus) y marcadores del metabolismo del tejido adiposo (Adiponectina) con la IR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

El presente trabajo se desarrolló como parte de un proyecto a diez años que se viene realizando desde el año 2001, sobre una población aproximada de 1000 empleados públicos de dos hospitales: Hospital "Dr. Ramón Madariaga" y Hospital de Pediatría "Dr. Fernando Barreyro" de Posadas (Misiones), destinado a evaluar sistemáticamente cada dos años los factores de riesgo cardiovascular, el síndrome metabólico y los hábitos de vida relacionados con aquellos.

Se estudiaron 176 empleados de estos 2 hospitales públicos, la población consta de 117 mujeres y 59 hombres con edades que van de 25 a 74 años y con una media $\pm$ DS de $49,01 \pm 9,33$ años.

Criterios de inclusión: fueron incluidos todos aquellos individuos que consintieron en participar de forma voluntaria.

Criterios de exclusión: Fueron excluidos aquellos individuos que presentaban diabetes, hipotiroidismo o hipertiroidismo, enfermedad infecciosa, renal, hepática o neoplasias y embarazadas.

La presión arterial (PA) fue tomada utilizando esfigmomanómetro de mercurio, en posición sentado, luego de 15 minutos de reposo, según normas de la American Heart Association. Se realizaron dos mediciones en el brazo derecho, con intervalos de 5 minutos entre cada una. Se utilizó el promedio de las dos mediciones y de acuerdo a esto los individuos fueron clasificados en: normotensos quienes tenían $PA < 120 / 80$ mmHg; prehipertensos aquellos con $PA \geq 120 / 80$ mmHg y $< 140 / 90$ mmHg e hipertensos si los valores de la PA fueron $\geq 140 / 90$ mmHg y/o individuos tratados.

La medida de la circunferencia de cintura, en centímetros y milímetros, se realizó en el punto medio de la zona abdominal entre el último arco costal y la cresta ilíaca con una cinta métrica inextensible, según criterios de la OMS. Se consideró obesidad abdominal cuando la circunferencia de cintura era ≥ 102 cm en hombres y ≥ 88 cm. en mujeres de acuerdo a los criterios del ATP III (31).

El peso, en kilogramos y gramos, fue determinado en balanza de pie con altímetro; la talla se midió en metros y centímetros, en posición de pie, con el paciente sin calzado ni objetos en la cabeza en posición Frankfurt, con los talones juntos, los hombros relajados y ambos brazos al costado del cuerpo; luego de realizar una inspiración profunda. Con estas medidas se estimó el índice de masa corporal o IMC ($\text{peso}/\text{talla}^2$), para clasificarlos según correspondía en: normopeso $IMC \geq 18,50$ kg/m^2 y < 25 kg/m^2 ; sobrepeso ≥ 25 kg/m^2 y < 30 kg/m^2 y obeso ≥ 30 kg/m^2 .

Obtención de muestras

Se realizó una extracción sanguínea obtenida por punción venosa, con un ayuno de 12 horas, se colocó en tubos primarios con separador de fases procediéndose a separar el suero en tubos secos y limpios para el autoanálisis, esto se realizó dentro de las 2 hs de extraídas las muestras, para las determinaciones bioquímicas (glucemia, insulinemia, PCRus y Adiponectina)

Parámetros bioquímicos

Se determinó la concentración sérica de Glucemia utilizando método enzimático colorimétrico final según Trinder (coeficiente de variación [CV] = 2,38%). Las muestras fueron procesadas en un autoanálisis Selectra Vitalab 2, con calibradores, sueros controles normal, patológico comerciales, y

control de calidad interno con pool de sueros preparado en el laboratorio. Además, se contó con un sistema de control de calidad externo por la suscripción a la Fundación Bioquímica Argentina. PCRus (Proteína C Reactiva ultrasensible) (CV= 2,1%) e Insulina (CV= 4,2%) se realizaron con un ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida en un equipo Immulite 2000 Siemens. Los niveles plasmáticos de Adiponectina fueron evaluados por el equipo ALISEI v 2.2 (autoanalizador automático de enzoinmunoensayo en microplaca-SEACP S.R.L -Florence, Italia) empleando anticuerpos monoclonales (ALPCO immunoassays) (CV= 3,2%) Con los datos de Glucemia e Insulinemia se calculó el índice de IR, HOMA (Homeostasis Model Assessment = insulina en ayunas ($\mu\text{U/ml}$) x glucosa en ayunas (mmol/l)/22,5) y se tomó como valor de corte para IR $\geq 2,6$ (32). Se tomó como valor de corte para Adiponectina, valores $< 5 \text{ ug/ml}$ como disminuidos y valores $\geq 5 \text{ ug/ml}$ como normales²⁸.

Análisis Estadístico

Se evaluó la distribución de la población con el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. De acuerdo a esto para el análisis descriptivo de las variables paramétricas se utilizaron las medias y los desvíos estándares; y para las variables no paramétricas se utilizó medianas y percentiles. Se utilizó para el análisis de correlación Rho de Spearman y para comparación entre grupos la prueba de U Mann Withney. Se realizó análisis multifactorial mediante regresión logística con la finalidad de identificar a las variables que explicaban de manera independiente la IR. Los resultados se analizaron con los programas estadístico Epi Info 6.04d. Todos los análisis se realizaron con un 95% de confianza y un nivel de significación < 0.05 .

Reparos Éticos

Todos los participantes del estudio fueron debidamente instruidos acerca de sus derechos como pacientes, así como de la confidencialidad de los datos y firmaron su consentimiento antes de iniciar el estudio, basado en la declaración de Helsinki.

A todos los empleados hospitalarios que participaron del estudio se les entregaron sus resultados y fueron asistidos por un profesional médico clínico, cardiólogo o endocrinólogo, según fuera el caso y a su vez la consulta con un nutricionista para un plan dietario según corresponda para cada individuo. Se programó una serie de actividades físicas con profesores de gimnasia para todos los participantes.

RESULTADOS

Se encontró que el 17,2% de los individuos presentaba IR. Cuando los evaluamos de acuerdo a su índice de masa corporal (BMI) encontramos un 24,3% de normopesos, 38,6% tenían sobrepeso y 37,3% presentaban obesidad. La obesidad abdominal se evaluó teniendo en cuenta los criterios de la OMS y los puntos de corte del ATP III y de acuerdo a esto el 38,8% de la población presentaba obesidad abdominal. El 26,6% presentaba pre-hipertensión o sea tenían presión arterial $\geq 120/80$ y el 50,6% eran hipertensos y/o recibían medicación antihipertensiva. El 45,7% presentaba concentraciones de adiponectina disminuida.

Tabla I: Características clínicas y bioquímicas de los 176 individuos del estudio

Variables		Media $\pm$ DS	Mediana (P25-P75)
Edad (años)		49,01 $\pm$ 9,33	NA
Circunferencia de cintura (cm)	Masculino	96,81 $\pm$ 10,25	NA
	Femenino	90,34 $\pm$ 13,16	NA
Índice de masa corporal (kg/m2)		28,78 $\pm$ 5,49	NA
Presión Arterial Sistólica (mmHg)		126,64 $\pm$ 17,97	NA
Presión Arterial Diastólica (mmHg)		84,57 $\pm$ 12,48	NA
Glucemia en ayunas (mg/dl)		NA	82 (73-90)
Insulinemia en ayunas (μ U/ml)		NA	4,0 (2,0-8,4)
HOMA		NA	0,81 (0,43-1,84)
Adiponectina total (μ g/ml)		NA	5,47 (3,82-7,96)
PCR hs (mg/lt)		NA	2,40 (3,82-7,96)

Referencias: P25: percentilo 25- P75: percentilo 75. NA: no aplica

Tabla II: Correlación del índice HOMA con índice de masa corporal, circunferencia de cintura y presión arterial en empleados hospitalarios (n=176)

Parámetro	rho	p
Índice de Masa Corporal (Kg/m ²)	0.54	< 0,001
Circunferencia de cintura (cm)	0.61	< 0,001
Presión Arterial Sistólica (mmHg)	0.31	0,007
Presión Arterial Diastólica (mmHg)	0.35	0,007

Referencias: Rho de Spearman

Tabla III: Insulino-resistencia y su relación con las concentraciones plasmáticas de Adiponectina y PCR hs, en empleados hospitalarios (n= 176)

Variables	Mediana (P25 - P75)	U de Mann Withney	p
ADIPONECTINA	IS 4,15 (2,18 – 5,97)	1185	< 0,001
	IR 5,87 (4,03 – 8,5)		
PCR	IS 2,20 (0,8 – 4,7)	1493	0,028
	IR 3,30 (2,20 – 5,70)		

Referencias: IS: insulino sensible- IR: insulino resistente

Tabla IV: Predictores de la insulino-resistencia hallados por análisis de regresión logística en empleados hospitalarios (n=176)

	B	DS	Estadístico	p
Constante	-14,78	3,558	17,23	<0,001
Adiponectina total	-3,68	0,115	10,26	<0,001
PCR hs	-0,067	0,441	0,441	NS
Índice de Masa Corporal	-0,09	0,092	0,009	NS
Presión Arterial Sistólica	-0,006	0,026	0,059	NS
Presión Arterial Diastólica	0,047	0,036	1,70	NS
Circunferencia de cintura	0,113	0,047	5,837	0,016

Referencias: **a**- variable dependiente: insulino-resistencia. **b**- Variables independientes: Adiponectina, PCR hs, BMI, cintura, Presión Arterial Sistólica, Presión Arterial Diastólica. DS: desviación estándar.

DISCUSIÓN

La frecuencia de insulino-resistencia encontrada en la población estudiada fue de 17,2%. Encontramos valores inferiores a lo publicado por otros autores quienes refieren frecuencias de insulino-resistencia que oscilan entre 25% y 39.6% (33-35). Las diferencias encontradas probablemente se deban a los criterios de selección de la población en estudio, donde habitualmente se incluye población general sin tener en cuenta algunos criterios de exclusión que fueron utilizados en este trabajo, como diabetes o glucemia en ayunas alterada. También cabe aclarar que el 37,3% de nuestra población era obesa mientras que entre el 50 y 60% de los individuos de los trabajos mencionados presentan obesidad (33-35).

La obesidad está propuesta como etiología en la resistencia a la insulina y fue puesta de manifiesto en muchos estudios epidemiológicos (8, 9, 14,15). En el presente trabajo se encontró una asociación significativa entre ambas, siendo estas precursoras al desarrollo de una Enfermedad Cardiovascular.

En nuestra población de empleados hospitalarios, la obesidad abdominal, a través de la medida de la circunferencia de cintura, ha correlacionado con la IR de forma altamente significativa y estos resultados hallados coinciden con varios estudios realizados por otros autores (14, 25,38, 39). Esta amplia gama de evidencia científica nos está hablando de un indicador de IR y que podría ser utilizado como predictor precoz de un evento cardiovascular (40). Sin embargo, hay que tener en cuenta que se han descrito casos de individuos con IR y sin obesidad abdominal.²⁴

Hemos hallado una correlación significativa entre PA e IR. Estos hallazgos se fundamentan en que la insulina produce activación del sistema nervioso simpático y absorción de sodio, originando un incremento en la resistencia periférica vascular y en la presión arterial^{5,12-15,37}.

Es importante destacar que en nuestra investigación, las concentraciones de adiponectina sérica se han asociado con una significancia alta con la IR, este dato coincide con bibliografías previas, en la que se destaca que desde el descubrimiento de esta hormona, numerosos grupos han reportado la existencia de una fuerte correlación negativa entre su nivel circulante y la IR, tanto en humanos como en animales, y en estudios in vivo como in vitro^{22,23,28,29}. Aún se desconoce si los niveles bajos de adiponectina son la causa o la consecuencia de estas patologías, es interesante especular que la variación genética puede disminuir los niveles circulantes de la adiponectina y por lo tanto predisponer a la IR, pero también se ha observado que una vez

que la IR se desarrolla, la supresión de los niveles circulantes de adiponectina se intensifica, y esto podría ser por la existencia de la susceptibilidad genética a la IR conferidos por los polimorfismos del gen ADIPOQ (28, 41).

Aunque la PCRus circulante es un marcador de inflamación, no está claro si es un verdadero predictor de evento cardiovascular y existen propuestas controvertidas al respecto^{36,37,42}. En nuestra población IR si había asociación con los niveles disminuidos de adiponectina y las concentraciones elevadas de PCRus.

No obstante, cuando evaluamos todas las variables de forma independiente para poder ver cual explicaba mejor la IR o tenía una mayor predicción del evento, solo la concentración plasmática de Adiponectina y la obesidad abdominal, a través de la medida de la circunferencia de cintura, podían hacerlo. Podríamos hablar entonces de estos dos parámetros como factores de riesgo emergentes, estos pueden abrir una nueva oportunidad para mejorar las estimaciones de riesgo actuales. Aunque el papel de los factores de riesgo emergentes en la mejora de la predicción de las actuales escalas de riesgo es controvertido. Dados su carácter pandémico y su impacto poblacional, son de singular interés los factores emergentes relacionados con la obesidad. La adiponectina y la circunferencia de cintura están relacionados con la obesidad. Sin embargo, para saber si mejora la capacidad predictiva del SCORE, sería necesario un estudio de cohorte.

CONCLUSIONES

En nuestra población de empleados públicos hospitalarios uno de cada cinco individuos presenta IR. Los parámetros que mejor explicaron el evento IR fueron la obesidad abdominal y la concentración de Adiponectina en suero. Podríamos hablar entonces de estos dos parámetros como factores de riesgo emergentes, estos pueden abrir una nueva oportunidad para mejorar las estimaciones de riesgo actuales.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in Misiones and Argentina, atherosclerosis is the main responsible and is now conceived as a chronic inflammatory process in which endothelial dysfunction plays a

crucial role, which promotes insulin resistance development. The aim of this study was in urban population of the countryside, represented by employees of two public hospitals in the province of Misiones, the prevalence of insulin resistance and its relation to CVD risk factors as blood pressure, general and abdominal obesity. Moreover, establishing the relationship between circulating levels of inflammatory markers and adipose tissue metabolism with the IR. We excluded individuals who had diabetes, hypothyroidism or hyperthyroidism, infectious disease, renal, or hepatic neoplasms and pregnant women. Blood sampling were taken for Glucose, Insulin, Adiponectin and hsCRP determinations. All samples were processed with internal quality controls and external. All samples were processed with internal quality controls and external. We evaluated 176 employees the 2 of public hospitals in Posadas, Misiones, 117 women and 59 men, aged 49.01 ± 9.33 years. We found that 17.2% of individuals had IR. Correlation was found between waist circumference, BMI, BP and HOMA index ($p < 0.01$). Adiponectin was associated with the IR ($p < 0.001$) but not hsCRP. The parameters that best explained the event IR were abdominal obesity and serum adiponectin concentration. We could talk then of these two parameters as emerging risk factors, they may open a new opportunity to improve current risk estimates.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferrante D, Virgolini M. Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2005: resultados principales. Prevalencia de factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares en la Argentina. *Rev Argent Cardiol* 75(1): 20-29, 2007.
2. Defunciones según grupo de edad, sexo y causa de muerte. Dirección de Estadísticas – Ministerio de Salud Pública de la provincia de Misiones. 2008.
3. Salud Mundial: Retos Actuales. Informe sobre la Salud en el Mundo. 2002. <http://www.who.int/evidence/bod/en/>
4. Muniyappa R, Montagnani M, Koh K, Quon MJ. Cardiovascular Actions of Insulin. *Endocrine Reviews* 28(5): 463-91, 2007.
5. Rojas J, Bermúdez V, Leal E, Cano R, Luti Y, Acosta L, Finol F, Aparicio D, Arraiz N, Linares S, Rojas E, Canelón R, Sánchez D. Insulinorresistencia e Hiperinsulinemia como factores de riesgo para enfermedad cardiovascular. *AVFT Caracas* 27(1), 2008.
6. Kawamoto R, Kohara K, Tabara Y, Habe M, Kusunoki T, Miki T. Insulin Resistance and prevalence of Prehipertensión and Hypertension Among community – Dwelling Persons. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 17(2): 148-55, 2010.
7. Ferguson TS, Younger NOM, Tulloch-Reid MK, Lawrence Wright MB, Ward EM, Ashley DE, Wilks RJ. Prevalence of prehypertension and its relationship to risk

- factors for cardiovascular disease in Jamaica: Analysis from a cross-sectional survey. *BMC Cardiovascular Disorders* 8: 20, 2008.
8. Cheng C, Daskalakis C, Falkner B. Association of Capillary Density and Function Measures with Blood Pressure, Fasting Plasma Glucose, and Insulin Sensitivity. *The Journal of Clinical Hipertensión* 12(2): 125-35, 2010.
 9. Rebolledo A, Milesi V, Rinaldi G, Grassi A. Insulina, Reactividad Vascular e Hipertensión Arterial. *Medicina* 56: 1-5, 1996.
 10. Molina de González-Méndez T, Vera M, Quiñónez M, Rivas I, Valery L. Síndrome metabólico como factor de riesgo para enfermedad cardiovascular. *Med Interna (Caracas)* 21(4): 228-37, 2005.
 11. La Relación entre Hipertensión y Resistencia a la Insulina Probablemente no sea Unidireccional. Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC). 2006.
 12. Nogueira Nascente FM, Veiga Jardim PC, Gondim Peixoto MR, Tronco Monego E, Sebba Barro WK, Graner Moreira H, Valverde de Oliveira Vítor P, Scala LN. Hypertension and its association with anthropometric indexes in adults of a small town in Brazil's countryside. *Rev Assoc Med Bras* 56(6): 716-22, 2010.
 13. Kahn B, Flier JF. Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 106(4): 473-81, 2000.
 14. Morrell J, Fox KA. Prevalence of abdominal obesity in primary care: the IDEA UK study. *Int J Clin Pract* 63(9): 1301-7, 2009.
 15. Canoy D, Boekholdt SM, Wareham N, Luben R, Welch A, Bingham S, Buchan S, Day N, Khaw KT. Body Fat Distribution and Risk of Coronary Heart Disease in Men and Women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition in Norfolk Cohort. *Circulation* 116: 2933-43, 2007.
 16. Poirier P. Adiposity and cardiovascular disease: are we using the right definition of obesity? *European Heart Journal* 28: 2047-48, 2007.
 17. Calabro P, Yeh ET. Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem.* 2007;42:63-91.
 18. Samia M et al; The Clinical Utility of High-Sensitivity C-Reactive Protein in Cardiovascular Disease and the Potential Implication of JUPITER on Current Practice Guidelines; *Clin Chem* 55:219-228, 2009.
 19. Wang Y, Xu A, Knight C, Xu LY, Cooper GL. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin: potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem* 2002; 277: 195-219.
 20. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2548-56.
 21. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79-83.
 22. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (Adipose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 286-9.
 23. Gil-Campos M, Cañete R, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance

- and obesity. *Clin Nutr* 200 Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7: 941-6.
24. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001; 108:1875-81.
 25. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1595-9.
 26. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, *et al.* Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 85-9
 27. Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, *et al.* Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension* 2003; 42: 231-4.
 28. Elissondo N, Gómez Rosso L, Maidana P, Brites F. Adiponectina: una adipocitoquina con múltiples funciones protectoras. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2008; 42¹: 17-33.
 29. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, *et al.* Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and apoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 2461-8.
 30. Li C, Ford E, Mcguire L, Mokdad A, Little R, Reaven G. Trends in Hyperinsulinemia Among Nondiabetic Adults In The U.S. *Diabetes Care*. 2006; 29:2396–2402.
 31. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report. *Circulation* 106: 3143-3421, 2002.
 32. Bonneau GA, Castillo Rascón MS, Pedrozo WR, Ceballos B, Leiva R, Blanco N, Berg G. Presencia de insulinoresistencia en Síndrome metabólico. *RAEM* 43⁴: 215-23, 2006.
 33. Coniglio R, Pino M, Cailotto M, Colombo O, Selles J, Framarini S, Malaspina MM, Salgueiro MA, Otero JC, Alvarez C, Polini N, Vásquez E, Camardon H, Menendez M, Benozzi L, Kelly V. Índice de insulinoresistencia y síndrome metabólico en un grupo poblacional del sur argentino. *Revista Argentina de Cardiología* 68⁵: 671-81, 2000.
 34. Santi J, Carrozas MA, Barba A, Astola A, Jiménez A, Mangas A. Circunferencia de la cintura como predictor de resistencia insulínica en varones jóvenes. *Med Clin Barc* 125: 46-50, 2005.
 35. Ascaso JF, Romero P, Real J, Lorente R, Martínez Valls J, Carmena R. Obesidad abdominal, resistencia a la insulina y síndrome metabólico en una población del sur de Europa. *European Journal of Medicine* 14: 101-6, 2003.
 36. Despre's JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rode's-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to Global Cardiometabolic Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1039-49, 2008.
 37. González Sotolongo O, Arpa Gámez A, Herrera Arrebató D, Álvarez VF, González

- EG. Valoración de la insulinoresistencia en pacientes con síndrome metabólico. *Rev. Cubana Med Milit* 34(1): 35-8, 2005.
38. Kunstmann SF. Síndrome Metabólico y Riesgo Cardiovascular. *Rev Med Clin Condes* 19(1): 40-6, 2008.
39. Li C, Ford ES, McGuire L, Mokdad AH, Little RR, Reaven GM. Trends in Hyperinsulinemia among Nondiabetic Adults in the U.S. *Diabetes Care* 29¹¹: 2047-48, 2006.
40. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CI, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* 288:1723-27, 2002.
41. Cook, Joshua R. and Semple Robert K. Hypoadiponectinemia—Cause or Consequence of Human “Insulin Resistance”? *J Clin Endocrinol Metab*, April 2010, 95(4):1544–1554
42. Vivencio Barrios, Ricardo Gómez-Huelgasb, Rosario Rodríguezc y Pedro de Pablos-Velasco. Adiponectina, un factor de riesgo cardiovascular emergente. Estudio REFERENCE. *Rev Esp Cardiol*. 2008;61(11):1159-67

INDICADORES DE INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS EN TRASTORNOS DEL METABOLISMO DEL HIERRO.

Prof. Dr. Fernando Daniel Brites, Dr. Jorge Arbelbide, Dra. Laura Estela Boero, Dr. Leonardo Gómez Rosso, Dr. Tomás Meroño
Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Dpto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, INFIBIOC, UBA, CONICET.

RESUMEN

Numerosos estudios han sugerido un aumento del riesgo de aterosclerosis en pacientes con alteraciones del metabolismo del hierro. De hecho, tanto en situaciones de exceso, como de deficiencia de hierro, existen evidencias de alteraciones en el metabolismo lipoproteico y presencia de biomarcadores de enfermedad cardiovascular.

En el presente trabajo, se realizaron estudios de diseño transversal y longitudinal. Los estudios transversales consistieron en la comparación de pacientes con sobrecarga de hierro (SH) y anemia ferropénica (AF), ambos grupos *versus* controles sanos pareados por sexo y edad. Por otro lado, acorde al estudio longitudinal, los pacientes fueron evaluados en distintos momentos de sus respectivos tratamientos. En particular, los pacientes con SH fueron evaluados al reclutamiento y al alcanzarse la meta de concentración de ferritina recomendada mediante flebotomías o eritroaféresis indistintamente (< 70 ng/ml); mientras que las pacientes con AF fueron evaluadas en estado basal (al ingreso al estudio), a las 72 horas de haber recibido una infusión endovenosa de 300mg de hierro sacarato y una vez superados los 12 g/dl de concentración de hemoglobina.

Todos los pacientes con SH ($n = 20$) fueron incluidos acorde al siguiente criterio: pacientes adultos de sexo masculino con SH diagnosticada al hallazgo de saturación de transferrina $>50\%$ y concentración de ferritina >300 ng/ml asociadas a detección de siderosis por biopsia hepática y/o mutaciones homocigota para hemocromatosis hereditaria; mientras que el criterio de inclusión de las pacientes con AF ($n = 20$) fue: adultos de sexo femenino con concentración de hemoglobina <12 g/dl, saturación de transferrina $<16\%$ y concentración de ferritina <15 ng/ml.

En los 20 pacientes con SH y las 20 pacientes anémicas y sus respectivos controles, se evaluaron peso, altura, presión arterial sistólica y diastólica.

A su vez, se les extrajo sangre de la vena antecubital luego de 12 horas de ayuno y se determinó el perfil lipoproteico, la concentración de apoproteínas, glucosa, insulina, proteína C reactiva-ultrasensible (PCR-us), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (métodos estandarizados), lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, interleuquina (IL)-6 (ELISA), y las actividades de la paraoxonasa (PON), utilizando paraoxón y fenilacetato como sustratos (métodos cinéticos-espectrofotométricos), de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP), y de la fosfolipasa A²-asociada a lipoproteínas (Lp-PLA²) por métodos radiométricos desarrollados. A su vez, se analizó la asociación entre los marcadores mencionados y el metabolismo del hierro, evaluado a través del hemograma, de los niveles de hierro sérico, de transferrina, de ferritina, y de la saturación de transferrina (métodos estandarizados), determinados como parte de los criterios de inclusión.

En el estudio comparativo de pacientes con SH y controles, como era esperable, los pacientes presentaron mayores niveles de saturación de transferrina y ferritina, y alteraciones del hepatograma consistentes en aumento de la concentración de bilirrubina total y de las actividades de las transaminasas hepáticas. A su vez, pese a que no se observaron diferencias significativas en los niveles de glucosa, la concentración de insulina de los pacientes duplicó la de los controles ($p < 0,001$).

Al comparar el perfil de lípidos y lipoproteínas de los pacientes con SH con el de los controles, el grupo de pacientes presentó un aumento significativo de las concentraciones de triglicéridos (TG) ($p < 0,001$) y disminución de los niveles de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) ($p < 0,005$).

Al evaluar la concentración de LDL oxidadas en circulación plasmática, se detectaron niveles significativamente elevados en los pacientes con SH con respecto a los controles ($p < 0,05$).

En relación a las proteínas y enzimas asociadas a lipoproteínas, los pacientes con SH mostraron tanto un aumento de la actividad de la CETP ($p < 0,05$), encargada del intercambio de colesterol esterificado por triglicéridos entre lipoproteínas, como de la Lp-PLA², enzima marcadora de inflamación vascular e involucrada en el proceso de oxidación de las LDL ($p < 0,05$).

Adicionalmente, se realizó la determinación de la actividad de la enzima antioxidante unida exclusivamente a las HDL, PON1. La actividad PON fue menor en los pacientes con SH respecto de los controles ($p < 0,05$), mientras que no se observaron diferencias en la actividad ARE ($p > 0,05$).

Debido a que la enzima PON, se halla unida a las HDL y que los pacientes con SH presentaron menor concentración de C-HDL, además

de resistencia insulínica, surge el interrogante de si estos factores o la SH podrían estar involucrados en la menor actividad de la PON. Por este motivo, se realizó un análisis multivariado en el que se definió la actividad PON como variable dependiente y la edad, el índice de masa corporal, el C-HDL, la actividad de CETP, el índice HOMA-IR y la concentración de ferritina, como variables predictoras o independientes. Este análisis identificó al HOMA-IR como el único factor significativamente asociado a la actividad PON, por lo que esta disminución sería atribuible principalmente a la resistencia a la insulina presente en los pacientes con SH ($\beta=-0,46$; $T=-2,47$; $p=0,02$).

Con el mismo objetivo, se realizaron análisis multivariados para el análisis de las variables predictoras de la actividad de CETP y de Lp-PLA². De modo similar a la enzima PON, la presencia de resistencia a la insulina explicó en mayor medida el aumento de la actividad de CETP ($B=65,9$; $p<0,0001$; $r^2=0,35$) siendo el rol del nivel de hierro de depósito no significativo. No obstante, al analizar la actividad de Lp-PLA² como variable dependiente, la concentración sérica de ferritina explicó por sí sola hasta un 40% de la variabilidad de la actividad enzimática ($B=3,7$; $p<0,0001$; $r^2=0,40$).

En el estudio comparativo de pacientes con AF y controles, como era de esperar dados los criterios de inclusión, las pacientes presentaron menor concentración de hemoglobina, ferritina y menor porcentaje de saturación de transferrina. A diferencia de los pacientes con SH, las pacientes con AF no presentaron mayor concentración de insulina, ni mayor índice HOMA-IR, con lo que la AF no se encontró asociada a resistencia a la insulina.

Respecto el perfil de lípidos y lipoproteínas, las pacientes con AF, presentaron aumento de TG ($p<0,05$) y disminución de C-HDL ($p<0,01$) respecto de los controles.

En línea con esta hipótesis, al estudiar la actividad de CETP, se evidenció un aumento significativo en las pacientes con AF ($p<0,05$). Más aún, la actividad de la Lp-PLA², la cual se encuentra asociada a la oxidación y modificación de las lipoproteínas, también fue mayor en las pacientes respecto a los controles ($p<0,05$). Por otro lado, al evaluar la actividad PON y ARE en el grupo de pacientes con AF en comparación con los controles sanos, no se observaron diferencias en la actividad PON ($p>0,05$). No obstante, la actividad ARE resultó menor en las pacientes con AF ($p<0,05$).

Se analizó la asociación entre los distintos factores de riesgo cardiovascular evaluados a través de correlaciones simples. Como era esperado, la actividad ARE correlacionó con el C-HDL, su transportador en circulación,

así como con la apo A-I. Por otro lado, la baja concentración de hierro en circulación (saturación de transferrina) también se vio asociada con menor actividad de ARE, así como con aumento de las actividades de CETP ($r=-0,62$; $p<0,001$) y de Lp-PLA² ($r=-0,32$; $p<0,05$). Por último, el agotamiento de los niveles de hierro de depósito (baja concentración de ferritina) se halló asociada a menor concentración de C-HDL ($r=0,39$; $p<0,05$) y a mayor actividad de CETP ($r=-0,49$; $p<0,005$).

En el período del subsidio se consiguió estudiar a 10 pacientes con SH en los que se logró la concentración de ferritina de mantenimiento recomendada (< 70 ng/ml). En este análisis, se evidenció una mejora en el hepatograma, caracterizada por una disminución significativa de la actividad de ALAT, en paralelo a disminución de la concentración de triglicéridos, de la actividad de CETP, y de los marcadores de inflamación (PCRus y Lp-PLA²), sugiriendo ello una relación entre la depleción de hierro y la reducción del riesgo cardiovascular en pacientes con SH.

En referencia al seguimiento de las pacientes con AF, inicialmente, se evaluó el efecto de la administración endovenosa de hierro a las 72 hs sobre los diversos biomarcadores de riesgo aterogénico en 18 de las 20 pacientes con AF. El tratamiento se asoció a un aumento de 3 veces la saturación de transferrina ($p<0,001$) y de 15 veces la concentración de ferritina ($p<0,0001$). Asimismo, 72hs post-infusión endovenosa se observó un aumento de la actividad ARE de la enzima antioxidante PON1 ($p<0,05$) y una disminución en la concentración de TBARS, marcadora de estrés oxidativo ($p<0,005$).

Por último, de las 20 pacientes iniciales, sólo se pudo estudiar a 7 una vez finalizado el tratamiento ($Hb>12g/dl$). Como era esperable, la concentración de hemoglobina, así como la saturación de transferrina fueron mayores al finalizar el tratamiento.

Al evaluar el perfil lipoproteico y la concentración de los biomarcadores de riesgo cardiovascular en los cuales se encontraron diferencias significativas en el estudio transversal, se observó una disminución significativa de las actividades de CETP ($p<0,001$) y Lp-PLA² ($p<0,05$), y del estrés oxidativo (concentración de TBARS) ($p<0,05$). No obstante, no se observaron cambios ni en la concentración de TG, ni en la de C-HDL.

Los estudios transversales permitieron la caracterización del perfil metabólico de los individuos ubicados en los dos extremos del metabolismo del hierro. Los pacientes tanto con SH, como con AF, difirieron de los controles en la concentración plasmática de TG y C-HDL. A su vez, a partir de los estudios longitudinales se observó que el correcto abordaje terapéutico

de ambas condiciones condujo a cambios beneficiosos en el metabolismo lipoproteico.

En particular, los pacientes con SH, aparte de las alteraciones en el perfil lipoproteico, presentaron: a) resistencia a la insulina, b) aumento de la actividad de CETP, c) niveles elevados de LDL oxidadas, d) baja actividad de la enzima antioxidante asociada a las HDL, PON y e) mayor actividad de Lp-PLA², con lo que se evidencia un mayor riesgo aterogénico en los pacientes con SH. Respecto a los mecanismos fisiopatológicos de estas alteraciones, los resultados de los estudios multivariados permitieron discriminar entre los efectos de la SH y la resistencia a la insulina. El hecho de que la concentración de ferritina haya explicado por sí sola hasta un 40% de la variabilidad total en la actividad del marcador de inflamación vascular, Lp-PLA², estaría indicando que el exceso de hierro sería el mayor determinante de la infiltración, y diferenciación de monocitos en el espacio subendotelial, proceso clave en la aterosclerosis. Por otro lado, la presencia de resistencia a la insulina se halló relacionada en mayor medida a modificaciones en los factores de riesgo lipídicos y con alteraciones en la composición de las lipoproteínas aterogénicas que la SH.

El tratamiento de los pacientes con SH se encontró principalmente asociado a una menor actividad de CETP y a una reducción significativa de la concentración de TG, modificaciones que sugieren una disminución del potencial aterogénico de las lipoproteínas con apo B. Asimismo, la reducción del hierro tisular se encontró asociada a disminución de los niveles de ambos marcadores de inflamación sistémica y vascular (PCR-us y Lp-PLA², respectivamente). En conjunto, estas observaciones podrían explicar en parte la relación entre depleción de hierro y reducción del riesgo cardiovascular descrita por algunos autores.

Por otro lado, en las pacientes con AF se evidenciaron a su vez: a) aumento de TG acompañado de disminución del C-HDL, b) disminución de la actividad ARE de la enzima PON1, y c) aumento de las actividades de CETP y Lp-PLA². Es de notar que estas modificaciones fueron compartidas con los pacientes con SH, con lo que tanto en la deficiencia como en la sobrecarga de hierro, alteraciones similares serían responsables del aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular. No obstante, en el caso de las pacientes con AF, la resistencia insulínica no sería parte del proceso fisiopatológico.

Respecto del tratamiento de la AF, la administración de hierro a las 72hs, indujo una activación de los mecanismos antioxidantes (mayor actividad ARE), lo cual se vio reflejado en la disminución de la concentración de

TBARS. Esta mayor defensa antioxidante específicamente en la lipoproteína antiaterogénica, HDL, podría estar a su vez involucrada en la disminución en la inflamación vascular (Lp-PLA²) observada para las pacientes con AF al finalizar el tratamiento. De este modo, la reposición de hierro a un organismo deficiente se encontraría asociada a una mayor neutralización de lípidos oxidados.

ABSTRACT

Alterations in iron metabolism have been related to high risk of cardiovascular disease. In the present study, both iron overload (IO) and iron deficiency (ID) were evaluated in cross sectional studies by comparing patients with sex and age-matched controls and in prospective studies before and after their corresponding treatments. A group of male patients with IO (n=20) showed significantly higher transferrin saturation, ferritin, bilirubin and transaminases in comparison with control subjects (n=20). Insulin levels were also increased in the patients group. Regarding the lipoprotein spectrum, patients with IO presented higher triglyceride, increased oxidized LDL and diminished HDL-cholesterol levels, as well as elevated activities of cholesteryl ester transfer protein (CETP) and lipoprotein-associated phospholipase A² (Lp-PLA²) and decreased paraoxonase activity. Ten patients were treated by phlebotomy or erythropheresis and after reaching ferritin levels < 70 ng/ml, they significantly decreased triglyceride levels, and CETP and Lp-PLA² activities. The group of women with ID (n=20) showed significantly lower haemoglobin, ferritin and transferrin saturation in comparison with control subjects (n=20). Patients also presented higher triglyceride and HDL-cholesterol levels, as well as increased CETP and Lp-PLA², and diminished arylesterase activities. Eighteen patients were treated by endovenous iron administration and evaluated after 72 h, which caused a three fold increase in transferrin saturation and 15 fold increase in ferritin levels. Arylesterase activity was also increased. When patients reached hemoglobin levels > 12 g/dl, CETP and Lp-PLA² activities also resulted to be significantly reduced (n=7). Then, both IO and ID shared different modifications in the lipoprotein profile, as well as in lipoprotein-associated enzymes. Moreover, the role played by iron levels as an atherogenic risk factor was also suggested by the results obtained in the interventional studies.

RELEVAMIENTO DEL CONTENIDO DE CALCIO EN LÁCTEOS DE USO MASIVO. CONSTRUCCIÓN DE UNA BASE DE DATOS DE ACCESO LIBRE.

Lucas R. M. Brun, María L. Brance, Hilda Moreno, Daniela Vicente.
Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral. Cátedra de Química
Biológica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario.

INTRODUCCIÓN

El calcio es el catión más abundante en nuestro organismo y es esencial, no sólo en el tejido óseo, sino también a nivel intracelular para la secreción exócrina, regulación enzimática, neurotransmisión, contracción muscular, entre otros. Como es de esperar, su nivel se encuentra estrechamente regulado por la parathormona y la vitamina D.

La absorción del calcio varía fundamentalmente a lo largo del ciclo de la vida, siendo la etapa de lactancia el período de mayor absorción (55-60%); en la adolescencia estos valores descienden (35-40%); para establecerse en un 30% en la etapa adulta. A partir de la mitad de la vida en adelante, la eficiencia de absorción declina casi 0.2% por año, con un porcentaje adicional del 2% en la menopausia¹.

Existe una relación inversa del consumo de calcio con la eficiencia de la absorción: ésta disminuye a medida que la cantidad ingerida aumenta, siendo éste un mecanismo adaptativo de protección a las altas concentraciones de calcio luminal. Está comprobado que superando 1 g/día de calcio en la dieta la absorción normalmente no supera 500-600 mg/día y se incrementa simultáneamente el calcio fecal².

La suplementación con calcio al aporte normal de la dieta es necesaria en ciertas etapas de la vida, estados metabólicos o enfermedades. La utilización de comprimidos de Ca es una opción, pero como toda medicación tiene inconvenientes tales como el costo y la adhesión del paciente al tratamiento. Si bien existen en el mercado una amplia variedad de productos que poseen calcio en buena proporción así como productos enriquecidos con calcio, no resulta sencillo estimar la cantidad de calcio que se ingiere a partir de ellos porque en muchos casos la cantidad de Ca no es provista por el fabricante en el envase.

El objetivo de este proyecto fue hacer un relevamiento del contenido de calcio en lácteos de consumo masivo y construir una base de datos de acceso libre que permita conocer el real contenido de calcio de los alimentos.

Dada la falta de información sobre la biodisponibilidad de calcio a partir de los diferentes lácteos a nivel experimental con animales y en humanos, se planteó como objetivo adicional evaluar la biodisponibilidad de calcio a partir de quesos, en ratas *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo de productos lácteos de locales de venta no siendo éstos solicitados a las empresas productoras.

Determinación de calcio

Las muestras se colocaron en un papel de filtro y posterior al secado se incineraron en mufla a 550°C durante 4 hs y la ceniza se disolvió en solución HCl 0.5 N. Las determinaciones se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica (Arolab MK II). En todos los casos se procesaron paralelamente muestras como standard con contenido de calcio conocido (0-100 µg/ml).

Biodisponibilidad de calcio a partir de diferentes tipos de quesos

Se utilizaron ratas Sprague Dawley hembras de 100 días a las que se les administró una dieta controlada y se determinó el porcentaje de absorción de Ca (%Ca). Se determinó la cantidad de Ca ingerido con el queso (CaQ) y la cantidad de calcio excretada en las 48 hs (Ca48). Con los datos de CaQ y Ca48 se calculó el %Ca = $(\text{CaQ} - \text{Ca48}) \times 100 / \text{CaQ}$ y la cantidad de calcio absorbido (Ca abs, mg) luego de la administración de cada muestra de queso. Se evaluaron queso rallado (900 mg%), reggianito en trozo (760 mg%), queso cremoso (500 mg%) y untable (270 mg%). Se utilizaron 4 ratas por cada tipo de queso investigado. Se administraron 3.1 g de queso rallado, 1.4 g de reggianito en trozos, 3.2 g de queso cremoso y 5.0 g de queso untable.

Software de calculador de consumo de calcio

Se desarrolló un software que permite el cálculo de la ingesta diaria de calcio de cada individuo de manera personalizada en función del sexo y la edad. Posteriormente y en función de los alimentos habituales de consumo el software sugiere dietas que permitan cubrir los requerimientos diarios de calcio.

RESULTADOS

Determinación de calcio

Se procesaron las muestras que se detallan en la tabla, se clasificaron por tipo prescindiendo de la marca ya que no hubo diferencias significativas en los valores entre ellas. Los valores se expresan en mg Ca/100 ml en caso de productos líquidos (leches) y en mg Ca/100 g de producto sólido o semi-sólido (quesos, yogurt, crema, dulce de leche). Los resultados de los valores medidos (VM) se compararon con los valores teóricos (VT) expresados por la empresa fabricante con la prueba T de student para una sola muestra de datos. Se consideraron diferencias significativas(**) si $p < 0.01$.

Producto	n	VT	VM	Producto	n	VT	VM
LE	7	110	134±5 **	Dulce de leche	19	193	212±57
LE + Ca	13	140	150±43	Queso crema	10	270	181±143
LD	8	110	150±25 **	Queso untable	18	347	342±104
LD + Ca	8	140	155±36	Queso cremoso	22	633	702±111
LP entera	3	888	1002±52	Queso por salut	12	650	581±129
LP descremada	9	1227	1232±186	Queso fynbo	3	700	936±37 **
LP desc + Ca	3	1850	1437±57 **	Queso provolone	3	900	926±42
Yogurt	18	98.60	113±39	Queso pategrás	10	961	944±95
Yogurt + Ca	3	400	499±58	Queso sardo	5	818	855±65
Crema de leche	19	64	66±17	Queso reggianito	24	1267	1312±88

LE: Leche entera. LD: Leche descremada. LP: Leche en polvo. + Ca: productos suplementados con calcio

Para una mayor simplicidad en los cálculos se sugiere agrupar los quesos en blandos (300 mg%), semiblandos (600 mg%), semiduros (900 mg%) y duros (1200 mg%).

Estos resultados se encuentran disponibles de manera libre y gratuita en el sitio web del Laboratorio de Biología Ósea de la Facultad de Cs Médicas - UNR (www.biologiaosea.com.ar).

Biodisponibilidad de calcio a partir de diferentes tipos de quesos

La variabilidad de los datos hizo imposible la comparación entre los cuatro tipos de quesos, razón por la cual se agruparon en quesos duros (reggianito en trozos y rayado) y quesos blandos (cremoso y untable). Se determinó

que el%Ca (media $\pm$ SD) con queso blandos (56 $\pm$ 9%) es mayor que para quesos duros (39 $\pm$ 2%). Cuando se compararon las cantidades absorbidas se encontró mayor absorción de Ca con los quesos blandos (8.5 $\pm$ 4.1 mg) que en los quesos duros (7.6 $\pm$ 1.6 mg). Se puede observar que no hay diferencias en la incorporación de Ca partir de quesos duros o blandos.

Software de calculador de consumo de calcio

Se definieron los puntos clave para el desarrollo del software de cálculo para lo cual se tendrá en cuenta los requerimientos de calcio (mg/día) según sexo y edad³. Lactantes y Niños de 0-6 meses: 300-400; de 7-12 meses: 400; 1-3 años: 500; 4-6 años: 600; 7-9 años: 700. Adolescentes de 10-18 años: 1300; Mujeres de 19 años hasta la menopausia: 1000. Mujeres Postmenopáusicas: 1300. Último trimestre de embarazo: 1200. Hombres de 19-65 años: 1000. Hombres de 65+ años: 1300.

A partir de un cuestionario cerrado el software estima el calcio ingerido por cada persona. Con esa información el software sugiere diferentes dietas para suplementar la dieta y alcanzar los requerimientos de calcio. Las dietas se dividen de la siguiente manera en función de los alimentos preferentes ya sea por gusto o posibilidades económicas: solo a base de leche, leche+quesos, leche+yogur, leche+yogur+queso, yogur+queso.

CONCLUSIONES

El desarrollo del proyecto ha aportado información valiosa sobre el contenido de calcio en los diferentes lácteos, especialmente para aquellos que no cuentan con el contenido de calcio en el envase. Los resultados demuestran que un 46% de los productos lácteos no presentan información sobre el contenido de calcio en el envase o de fácil ubicación a través de medios de comunicación o información de la empresa. Es de destacar que se ha hallado amplia coincidencia entre los valores detallados por los fabricantes y los medidos en el laboratorio.

Es importante destacar que no es suficiente conocer solo el contenido de Ca sino también es necesario saber sobre su biodisponibilidad ya que esta influirá en el aprovechamiento del catión por el organismo. Por ello de los experimentos de biodisponibilidad se concluye que desde el punto de vista nutricional sería conveniente la suplementación de Ca utilizando quesos de bajo contenido cálcico, favorecido además por el menor contenido de sodio y

de grasa. Dada la baja cantidad de Ca en la leche comparado con los quesos y dada la poca diferencia entre leche fortificada y no fortificada, no se pudieron realizar experimentos de biodisponibilidad con leche.

Los resultados de este proyecto permitirán estimar de una mejor y fácil manera las cantidades de Ca ingeridas tanto a profesionales como al público en general. Con esta información es posible calcular la cantidad de Ca necesario para alcanzar a los requerimientos diarios de Ca, siendo esto posible utilizando fuentes naturales de Ca.

ABSTRACT

Calcium is essential in nutrition. Its absorption varies along the life cycle: infancy (55-60%), adolescence (35-40%), adult (30%). From adulthood absorption efficiency declines by 0.2% per year, with an additional of 2% at menopause. Supplementation with tablets have a cost and need patient adherence to treatment. While on the market a wide variety of products that have calcium in good proportion is not easy to estimate the amount of calcium ingested. The objective of this project was to survey the content of calcium in dairy products. Calcium content was analyzed by atomic absorption spectrophotometry. The samples were classified by type apart from the mark as there were no significant differences between them. The results of the measured values were compared with theoretical values. It has been found coincidence between the theoretical values and measured values. In few cases the measured values was greater (whole milk, skimmed milk and Fynbo cheese). Only in one case (skimmed milk powder fortified with calcium) the measured value was lower than that reported by the company. The project has provided valuable information on the calcium content of different dairy products, especially those who lack the calcium content in the container.

REFERENCIAS

1. Torresani ME. Enfoque nutricional en la prevención de la osteoporosis. *Actualiz Osteol*; 3(2): 76-80. 2007.
2. Norman AW. Vitamin D metabolism and calcium absorption. *Am J Med*; 67(6):989-98. 1979.
3. International Osteoporosis Foundation.

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE INFECCIONES CAUSADAS POR LEVADURAS PERTENECIENTES AL GENERO *CRYPTOCOCCUS* MEDIANTE EL EMPLEO DE TÉCNICAS MOLECULARES. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS Y VARIEDAD DE AISLAMIENTOS AUTÓCTONOS.

Carnovale Susana, Anyelen Dilaj

Centro de Micología. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. UBA
IMPAM (UBA-CONICET)

INTRODUCCIÓN

La cryptococosis es una micosis sistémica cuyo agente etiológico es una levadura capsulada del genero *Cryptococcus*. Este patógeno oportunista y cosmopolita vive en el ambiente, desde donde penetra por vía inhalatoria llegando a los alvéolos pulmonares del huésped, pudiendo luego diseminarse a otras partes del organismo.

Las manifestaciones clínicas son muy variadas, la enfermedad es potencialmente severa en individuos inmunocomprometidos, como pacientes con SIDA, transplantados y en enfermos tratados con corticoides. En ellos la manifestación clínica más frecuente es la meningitis o meningoencefalitis. La patogenia de la enfermedad resultará de la interacción entre el estado inmune del huésped, virulencia y tamaño del inóculo.^{8,9}

El género *Cryptococcus* reconoce dos especies patógenas, *C.neoformans* y *C.gatti*. *C.neoformans* es un hongo de distribución geográfica universal mientras que *C. gatti* predomina en suelos tropicales y subtropicales. Hasta el presente han sido reconocidas dos variedades de *C.neoformans* con diferentes ecología, epidemiología que afectan a huéspedes con características inmunológicas opuestas: *C. neoformans* var. *grubii* mundialmente distribuida, y *C. neoformans* var. *neoformans* principalmente encontrado en el sur de Europa.²

En los últimos años una serie de técnicas moleculares han sido empleadas para caracterizar aislamientos de hongos de importancia médica. La posibilidad de realizar estudios moleculares utilizando el ADN de esta levadura ha permitido adquirir mayores conocimientos acerca de su epidemiología. La técnica molecular de PCR permitió clasificar los aislamientos de este hongo en ocho tipos moleculares: VNI (var. *grubii*, serotipo A), VNII (var.

grubii, serotipo A), VNIII (serotipo AD), VNIV (*var. neoformans*, serotipo D), VGI, VGII, VGIII y VGIV (*var. gattii*, serotipos B y C).^{1,10}

Estudios realizados por un conjunto de países iberoamericanos en el año 2007 demostraron que el 68% de los aislamientos pertenecían a *C. neoformans var. grubii* lo cual concuerda con el hecho que se trata de una variedad cosmopolita.⁷

El objetivo de este estudio fue genotipificar los aislamientos autóctonos estudiados, determinar la especie y variedad de los mismos. Los resultados obtenidos en este estudio permitieron establecer una posible relación epidemiológica entre aislamientos clínicos y estado inmunológico de los hospederos.

MATERIALES Y METODOS

En la presente investigación se estudiaron 53 aislamientos de hongos levaduriformes aisladas en líquidos cefalorraquídeos (LCR) de pacientes inmunocomprometidos (VIH positivos) que fueron atendidos en centros de salud de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Las cepas fueron recolectadas en el período que abarca desde el año 1997 hasta el año 2007, distribuyéndose de la siguiente manera: 15 cepas (año 1997), 10 cepas (año 2000), 12 cepas (año 2002) y 16 cepas (año 2007)

Las levaduras fueron identificadas según su capacidad en la producción de cápsula polisacáridica (prueba de la tinta china), producción de ureasa en medio de Christensen, pruebas de fermentación y asimilación de carbohidratos por método comercial (Api 20 C, Bio Merieux, Francia) y producción de la enzima fenol oxidasa en agar semilla de girasol.

ESTUDIO MOLECULAR

Extracción de ADN: Se efectuó una ruptura mecánica con nitrógeno líquido y arena estéril siguiendo el protocolo propuesto por *Meyer et al*/modificado por el uso de arena estéril en lugar de perlas de vidrio Se purificó el material extraído con proteinasa K y RNasa y se extrajo el mismo con fenol y cloroformo. Posteriormente se precipitó con alcohol etílico y se suspendió en buffer de TE. El ADN genómico extraído fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en buffer TBE 1X y lectura espectrofotometría

(Abs 260/280). Se comparó la técnica anterior con la descrita por *Del Poeta et al.* La misma reemplaza el uso de nitrógeno líquido por un detergente como el Tritón X-100.^{3,5}

Determinación de la Variedad: la variedad de cada aislamiento se identificó amplificado al material genético obtenido mediante la técnica de PCR y corrida electroforética de los productos obtenidos en gel de agarosa al 0.8%. Los cebadores utilizados fueron

CNa-70-S (5'-ATTGCGTCCACCAAGGAGTC-3')

CNa-70-A (5'-ATTGCGTCCATGTTACGTGGC-3').

Tipos moleculares: El mismo se determinó con la técnica de PCR fingerprinting. Se utilizó la secuencia microsatélite M13 (5'-GAGGGTGGCGG-TTCT-3') siguiendo el protocolo descrito previamente por Meyer y col. citado anteriormente.^{4,6} Se utilizaron como patrones de genotipo las cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* WM 148 **VNI**, WM 626 **VNII**, WM 628 **VNIII** y WM **VNIV**

RESULTADOS

Los resultados de los métodos convencionales permitieron identificar a todos los aislamientos como pertenecientes al género *Cryptococcus* especie *neoformans*.

La electroforésis de los productos de amplificación obtenidos con los cebadores CNa-70-S y CNa-70-A permitió observar una banda de ADN, en todas los aislamientos estudiados, de aproximadamente 730 pb que se correspondería a la identificación de *C. neoformans* var. *grubii*. El de las cuales 50 cepas demostraron pertenecer al genotipo VNI (94%) y 3 (6%) de los mismos al genotipo VNII.

CONCLUSIONES

Mediante el análisis espectrofotométrico del material extraído pudimos determinar en nuestro estudio que no se observan diferencias en el rendimiento de las técnicas de extracción utilizadas. El ADN obtenido por ambas técnicas fue óptimo para la aplicación posterior de las técnicas de amplifica-

ción. De esta manera comprobamos la utilidad de metodologías más económicas que pueden servir de alternativa para la extracción de material genético a partir de la célula fúngica levaduriforme.

Por otro lado la genotipificación de los aislamientos obtenidos en nuestra región permitió determinar que no existirían hasta el momento diferencias epidemiológicas con los resultados documentados en estudios anteriores. La prevalencia de especie y variedad fue similar en nuestros pacientes inmunocomprometidos VIH positivos y prevaleció el aislamiento de *C. neoformans* var. *grubii* VNI a través del paso del tiempo.

ABSTRACT

The *Cryptococcus* encapsulated yeast is the etiologic agent of the systemic mycosis known as cryptococosis. Meningitis or meningoencephalitis is its most frequent expression. The *Cryptococcus* genus distinguishes two pathogenic species: *C. neoformans*, which has a universal geographical distribution, and *C. gattii* which appears mainly on tropical and subtropical soils. Two varieties of *C. neoformans* with different ecological and epidemiological characteristics have been identified. They affect hosts with opposite immunological characteristics: *C. neoformans* var. *grubii* which is worldwide distributed and *C. neoformans* var. *neoformans* mainly found in the south of Europe. The isolates have been classified into eight molecular types with the PCR technique: VNI (var. *grubii*, A serotype), VNII (var. *grubii*, A serotype), VNIII (AD serotype), VNIV (var. *neoformans*, D serotype D), VGI, VGII, VGIII y VGIV (var. *gattii*, B and C serotypes). In this research 53 positive HIV patients' cerebrospinal fluid isolates have been studied. The strains, which were collected from 1997 to 2007, were analysed by conventional methods which led to their identification as *Cryptococcus* species *neoformans*. The genetic material was studied with two different molecular techniques and no differences were observed as regards their quality and performance. It was amplified with the CNa-70-S and CNa-70-A primers which led to the identification of var. *grubii* in all isolates. The isolate genotyping with the M13 sequence resulted in the 94% VNI prevalence and just 6% for VNII.

BIBLIOGRAFIA

1. Aoki F., Tamae I., Tanaka R., Mikami Y., Taguchi H., Nishimura N., Nishimura K., Misahaji M., Schreiber A., Barnchini M. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotyping A or B prepared on the basis of Random Amplified Polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 315-20
2. Bava AJ, Negroni R. Características epidemiológicas de 105 casos de criptococosis diagnosticados en la República Argentina entre 1981-1990. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992; 34: 335-40
3. Casali a., Goulart L., Silva L., Ribeiro A., Amaral A., Alves S., Scrank A., Meyer W., Vainstein M. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS*. 2003; 405-15.
4. Castañón Olivares L., Martínez Martínez K.; Bermudez Cruz R., Martínez Rivera MA., Mayer W.; Arreguin Espinosa R., Lopez Martínez R.; Ruiz Palacios y Santos GM. Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C. gatii* by PCR fingerprinting. *Medical Mycology*. 2009, 47: 713-21
5. Del Poeta M., Toffaletti D., Rude T, Dykstra Ch, Heitman J., Perfect J. Topoisomerase I Is Essential in *Cryptococcus neoformans*: Role in Pathobiology and as an Antifungal Target. *Genetics* 1999 May;152(1):167-78
6. Lo Passo C. Pernice I., Gallo M., Barbara C., Todaro Luck F., Criseo G., Pernice A. Genetic Relatedness and Diversity of *Cryptococcus neoformans* Strains in the Maltese Islands. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35: 751- 55.
7. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, Ibero American Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 189-95.
8. Ministerio de Salud de la Nación. Boletín sobre el VIH-sida en la Argentina. Buenos Aires, Argentina. 2012; Año XV: N° 29.
9. Negroni R. Cryptococcosis. *Clin Dermatol* 2012; 30: 599-609.
10. Ulrich K.; Ngamskulrungronj P.; Meyer W. M13 PCR fingerprinting detects genetic instability of *Cryptococcus gatti* after passage through a rat model of infection. *Australasian Mycologist*. 2009;28:20-23.

ESTUDIO DE ÁRBOLES AUTÓCTONOS COMO NICHOS ECOLÓGICOS DE ESPECIES PATÓGENAS DEL GÉNERO *CRYPTOCOCCUS*

Cattana, Maria Emilia; Mangiaterra, Magdalena Leonilda;
Rojas, Florencia Dinorah.

Instituto de Medicina Regional – Universidad Nacional del Nordeste

INTRODUCCIÓN

Cryptococcus neoformans (*C. neoformans*) fue descubierto a fines del siglo XIX por Sanfelice, quien aisló el microorganismo de jugo de durazno^{1,2,3}.

El nombre *Cryptococcus* designa a la fase anamorfa de un hongo clasificado dentro de la división *Basidiomycota*; el estado teleomorfo se denomina *Filobasidiella*. Este género es levaduriforme y se caracteriza porque posee una cápsula compuesta por polisacáridos de alto peso molecular, que es el principal factor de virulencia. Hay alrededor de 70 especies de *Cryptococcus* pero la taxonomía de este grupo está actualmente siendo reevaluada dado que la biología molecular ha mostrado diferencias entre los especímenes que anteriormente se clasificaban como variedades⁴. De todas las especies, las que se encuentran dentro del denominado complejo *C. neoformans* - *C. gattii* son las más patógenas para el hombre y otros animales. Sin embargo, *Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus albidus* han sido hallados ocasionando enfermedad en animales y humanos con la inmunidad comprometida, ya sea por estar afectados por HIV, cursando tratamientos quimioterápicos o por padecer inmunosupresión metabólica.^{5,6,7,8}

C. neoformans fue descrito como patógeno humano por primera vez en el año 1894, cuando Busse y Buschke, en Alemania, registraron el primer caso clínico en una mujer³. En nuestro país, las dos primeras observaciones de criptococosis fueron hechas por Flavio Niño en 1928 y 1936⁹.

Actualmente, las dos especies de *Cryptococcus* consideradas patógenas pertenecen al denominado complejo *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* que está formado por: *C. gattii* (serotipos B y C) y *C. neoformans* con dos variedades, *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) y el *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D). Existiendo también un híbrido de estas dos últi-

mas variedades, el serotipo AD. Cada especie difiere bioquímica, biológica y epidemiológicamente, tanto en sus hospedadores naturales como en la manifestación de la enfermedad^{2,10-12}.

Las especies y variedades difieren en su distribución geográfica. *C. neoformans* se halla en todo el mundo mientras que *C. gattii* prevalece en zonas de clima tropical y subtropical, aunque ya existe sobrada evidencia de que amplió su distribución en el ambiente.¹³⁻¹⁷

C. neoformans var. *neoformans* ha sido aislado de diferentes fuentes naturales. Su reservorio principal son las deyecciones de palomas y otras aves, aunque se han informado aislamientos de lavados nasales de perros y gatos en Australia¹⁸.

C. neoformans var. *grubii* es de distribución mundial. Aparece naturalmente en guano de aves y en los huecos de algunos árboles, también ha sido aislado de excretas de canguros, pelo de lobo, así como de jaulas de tigres y avestruces^{19,20}.

C. gattii ha sido aislado de varias especies de eucaliptos, de guano de murciélago y de avispas (*Polybia occidentales*)^{12,13,21,22}.

Varias especies del género *Cryptococcus* han sido halladas distintas familias y géneros de árboles de diferentes lugares del mundo.^{15,17,19,23-28}

En las últimas décadas del siglo XX la incidencia de la criptococosis subió dramáticamente principalmente debido la epidemia de SIDA¹¹. Hoy ocupa el cuarto lugar dentro de las infecciones oportunistas que afectan a los pacientes VIH positivos. En estos pacientes, en la República Argentina, su incidencia es mayor que en los Estados Unidos y Europa superando el 10% de los casos de SIDA y constituye una de las causas más frecuentes de muerte^{9,30}.

Las cepas de serotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*) son las que afectan a más del 90% de pacientes con SIDA, mientras que *Cryptococcus gattii* afecta clásicamente a pacientes inmunocompetentes. En la Isla de Vancouver hubo un brote que ilustra la habilidad de este organismo para causar enfermedad en individuos que clásicamente no se consideran de alto riesgo^{9,11,16}.

En Argentina, a pesar de que la incidencia de la criptococosis ha aumentado 40 a 50 veces a partir de la pandemia del SIDA, el conocimiento que se tiene sobre la distribución ambiental de *Cryptococcus* es escaso (30,31). Las ciudades de Resistencia y Corrientes se encuentran cerca del límite con Brasil y Paraguay donde este hongo es endémico. Todos estos datos avalan la necesidad de ampliar el conocimiento sobre la ecología de este género y la epidemiología de la criptococosis, tanto en el ser humano como en animales,

constituyendo un importante estímulo para proseguir en los estudios sobre el tema.

Así, el objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de especies del género *Cryptococcus* en árboles de las ciudades de Resistencia y Corrientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante los años 2010 y 2012 se realizaron tomas de muestra en 5 plazas (Plaza principal 25 de Mayo, Plaza España, Plaza 9 de julio, Plaza Belgrano, Plaza 12 de Octubre), en el predio del campus de la Universidad Nacional del Nordeste y en el Paseo de los Artesanos de la ciudad de Resistencia y del Paseo Arazaty, del Parque Mitre, la costanera sur y 2 plazas (Plaza Cabral, Plaza 25 de Mayo) de la ciudad de Corrientes.

Recolección

Las muestras se tomaron frotando las grietas de la corteza y los huecos de los árboles con un hisopo humedecido en solución salina estéril (0,85% ClNa) suplementada con cloranfenicol (10 mg/ml), recogiendo así los detritos depositados en estos lugares. Los hisopos se transportaron en tubos de ensayo con 3ml de dicha solución.

Aislamiento

Sin retirar los hisopos, los tubos se agitaron manualmente durante 5 minutos. Luego se retiraron los hisopos y se dejó sedimentar la solución durante 10 minutos.

Con el sobrenadante, se realizaron diluciones 1:10 en solución fisiológica estéril. De la dilución y el sobrenadante, se sembraron 100 µl, en placas separadas, en medio de Pal (32) suplementado con bifenilo (0,1%). Las placas inoculadas se incubaron a 32°C. A partir de las 48 horas y durante 7 días, se aislaron las colonias levaduriformes con coloración marrón y/o aspecto cremoso o mucoide. El aislamiento se realizó en medio de Sabouraud.

Identificación:

1. Test de la tinta china para la observación de cápsula
2. Prueba de ureasa
3. Pruebas de fermentación
4. Pruebas bioquímicas para identificación de especies:

Medio de canavanina, glicina y azul de bromotimol (CGB)

Auxonograma (pruebas de asimilación de compuestos carbonados y de nitrógeno)

Todas las cepas fueron incorporadas al cepario del Área de Micología del Instituto de Medicina Regional (UNNE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 170 árboles muestreados, en 15 se encontraron levaduras del género *Cryptococcus*.

Todas las cepas que presentaron coloración marrón en el medio de Pal fueron consideradas como especies pertenecientes al complejo *C. neoformans* - *C. gattii*, a las que luego se les realizaron prueba de ureasa, fermentación, auxonograma y medio de CGB. A las cepas de aspecto mucoide blanquecino-crema en el medio de Pal se les practicó pruebas de ureasa, fermentación y auxonograma para su identificación a nivel de especie.

En las **Tablas 1 y 2** se indican las especies de árboles de las cuales fueron aisladas dichas cepas en las ciudades de Corrientes y Resistencia respectivamente.

Tabla 1. Árboles muestreados en la ciudad de Corrientes

Nombre común	Nombre científico	Número muestreado (n=55)	Autóctono	Aislamientos (n=6)
Lapacho rosado	<i>Tabebuia avellanedae</i> (<i>T. impetiginosa</i>)	6	si	-
Ibirá pitá	<i>Peltophorum dubium</i>	9	si	<i>C. albidus</i> (2)
Chivato	<i>Delonix regia</i>	3	no	<i>C. albidus</i> ¹
Lluvia de oro	<i>Cassia fistula</i>	2	no	-
Tipa	<i>Tipuana tipu</i>	22	si	<i>C. neoformans</i> ¹
Roble sedoso	<i>Grevillea robusta</i>	1	no	-
Eucaliptus	<i>Eucaliptus</i> sp.	1	no	-
Gomero/ Higuera de la India	<i>Ficus elastica</i>	5	no	-
Jacarandá	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	3	si	-
Brachichito	<i>Brachychiton populneus</i>	1	no	-
Timbó	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	1	si	<i>C. albidus</i> ¹
Palo borracho	<i>Ceiba speciosa</i>	1	si	<i>C. albidus</i> ¹

Tabla 2. Árboles muestreados en la ciudad de Resistencia

Nombre común	Nombre científico	Número muestreado (n=115)	Autóctono	Aislamiento (n=9)
Tipa	<i>Tipuana tipu</i>	50	si	<i>C. neoformans</i> ¹
Eucaliptus	<i>Eucaliptus</i> sp.	10	no	-
Lapacho rosado	<i>Tabebuia avellanedae</i> (<i>T. impetiginosa</i>)	8	si	<i>C. neoformans</i> ¹
Jacarandá	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	5	si	<i>C. laurentii</i> ¹
Álamo	<i>Populus</i> sp.	2	no	-
Tuya	<i>Thuja</i> sp.	2	no	<i>C. neoformans</i> ¹
Brachichito	<i>Brachychiton populneus</i>	2	no	-
Roble sedoso	<i>Grevillea robusta</i>	4	no	<i>C. gattii</i> ²
Quebracho colorado	<i>Schinopsis balansae</i>	1	si	-
Palo borracho	<i>Ceiba speciosa</i>	4	si	-
Pino	<i>Pinus</i> sp.	7	no	-
Timbó	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	3	si	-
Chivato	<i>Delonix regia</i>	1	no	-
Crespón	<i>Lagerstroemia indica</i>	1	no	-
Falso caoba/Pata de Vaca	<i>Bauhinia forficata</i>	2	si	-
Mirto	<i>Myrtus communis</i>	2	no	-
Ibirá pitá	<i>Peltophorum dubium</i>	7	si	<i>C. neoformans</i> ³
Alcanfor	<i>Cinnamomum camphora</i>	1	no	-
Ciprés de los pantanos	<i>Taxodium distichum</i>	3	no	-

Cryptococcus gattii fue aislado por primera vez en 1990 por Ellis y Pfeiffer a partir de *Eucalyptus spp* en Australia, hecho a partir del cual se ha señalado a este árbol como principal nicho ecológico para este microorganismo. Sin embargo, el aislamiento de *C. gattii* a partir de *Eucalyptus* fuera de Australia es poco frecuente^{17,29,33}. En nuestro estudio, pese a muestrear dicha especie arbórea, no se hallaron en ninguno de ellos cepas del género *Cryptococcus*.

Si bien el principal nicho ecológico de *C. neoformans* se asocia a excretas de palomas, esta levadura también ha sido aislada de huecos de troncos de árboles^{17,33,34}. En nuestro estudio *C. neoformans* ha sido aislado de especies arbóreas autóctonas como *Tipuana tipu* en la ciudad de Corrientes y Resistencia y de *Tabebuia avellanedae*, *Peltophorum dubium* en la ciudad de Resistencia.

CONCLUSIONES

Los árboles de esta región como *Peltophorum dubium*, *Tipuana tipu*, *Ceiba speciosa*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Tabebuia avellanedae* (*T. impetiginosa*), *Jacaranda mimosifolia* pueden ser nicho ecológico de las especies del género *Cryptococcus* reconocidas como patógenas, convirtiendo a estos árboles en potenciales fuentes de infección para los animales y humanos del lugar.

Sería interesante realizar la relación genética que existe entre las cepas ambientales de *Cryptococcus* y las cepas aisladas de muestras clínicas para confirmar esta hipótesis y poder tomar acciones para evitar la infección con estos agentes, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos, donde la morbi-mortalidad es más altas que en pacientes inmunocompetentes, aunque estos también pueden ser afectados.

ABSTRACT

In Argentina, information about epidemiology and environmental distribution of *Cryptococcus* is scarce. Resistencia and Corrientes cities are near the border of Brazil and Paraguay where this fungus is endemic. This supported the need to investigate the ecology of this genus and the epidemiology of cryptococcosis in this area.

The aim was to investigate the presence of species of the *Cryptococcus* genus in trees of the cities of Resistencia and Corrientes.

One hundred and seventy trees were sampled by swabbing technique. The isolates were identified using urease activity, carbohydrates fermentation and assimilation of nitrogen and carbon source. Differentiation of *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex was determined by the color reaction test on the canavanine-glycine-bromotymol blue agar medium.

Cryptococcus was found in 15 out of the total trees. 7 out of 15 *Cryptococcus* isolates were identified as *C. neoformans* (one in Corrientes city and six in Resistencia city), five isolations were identified as *C. albidus* (all of them from Corrientes city), two as *C. gattii* (all of them from Resistencia city) and one as *C. laurentii* in Resistencia city. *C. neoformans* strains were isolated from *Tabebuia avellanedae*, *Tipuana tipu*, *Thuja sp.* and *Peltophorum dubium*. Both isolates of *C. gattii* were isolated from *Grevillea robusta*. *C. albidus* strains were isolated from *Peltophorum dubium*, *Delonix regia*, *Ceiba*

speciosa, *Enterolobium contortisiliquum*, and *C. laurentii* was isolated from *Jacaranda mimosifolia*.

Native trees of northeastern Argentina are able to be hosts of the species recognized as pathogenic of *Cryptococcus* genus. This fact allows us to suggest that these trees are potential sources of infection for animals and human. This is the first epidemiological and ecological study about *Cryptococcus* genus developed in northeastern Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arenas R. Criptococosis En Micología Médica Ilustrada. 3a Edición. Interamericana-McGraw-Hill. México. 2008: 239-246.
2. Rippon JW. Criptococosis. En Micología médica. Hongos y Actinomicetos patógenos. 3a Edición. Interamericana-McGraw-Hill. México. 1990:629-659.
3. Drouhet E. Milestones in the history of *Cryptococcus* and cryptococcosis. J Mycol Med 1997; 7:10-27.
4. Fonseca A, Boekhout T, Fell JW. *Cryptococcus* Vuillemin (1901). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (Eds.). The Yeasts, A Taxonomic Study (Fifth Edition). Elsevier B.V, 2011:1661-1737.
5. Cheng MF, Chiou CC, Liu YC, Wang HZ, Hsieh KS (2001) *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. Journal of Clinical Microbiology. 39(4):1608–11.
6. Shankar EM, Kumarasamy N, Bella D, Renuka S, Kownhar H, Suniti S, Rajan R, Rao UA. Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS. Can Respir J. 2006; 13(5):275-8.
7. Endo JO, Klein SZ, Pirozzi M, Pirozzi C, Hull CM. Generalized *Cryptococcus albidus* in an immunosuppressed patient with palmopustular psoriasis. Cutis. 2011; 88(3):129-32.
8. Labrecque O, Sylvestre D, Messier S. Systemic *Cryptococcus albidus* infection in a Doberman Pinscher. J Vet Diagn Invest. 2005; 17:598–600.
9. Bava Ja. Criptococosis en la República Argentina Rev. Arg. Micología 1993, XVI, 3: 3-41.
10. Kidd SE, Sorrell TC & Meyer W. Isolation of two molecular types of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from Insect Frass. Med Mycology. 2003, 41: 171-176.
11. Casadevall A, Pirofsky LA. Feasibility and prospects for vaccine to prevent cryptococcosis. Med. Mycology. 2005; 43:667-680.
12. Ducan D, Stephen C, Lester S & Bartlett KH. Follow-up study of dogs and cats with asymptomatic *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* infection or nasal colonization. Med. Mycology. 2005; 43:663-666.
13. Torres-Rodríguez J.M; Baró T; de Mendiza M.H; Morera Y; Alía C. Primeros aislamientos autóctonos de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en España. Cartas al editor. Rev. Iberoam. Micol. 1997; 14:36.

14. Ordoñez N & Castañeda E. Varieties and serotypes of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates in Colombia. Rev. Iberoam. Micología. 2001; 18:128-130.
15. Colom Valiente M.F.; Alberdi M; Meseguer I; Torres- Rodríguez J.M. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras de medio ambiente de Alicante. Rev Iberoam Micol 1997; 14:63-64.
16. Kidd JD; Hagen F, Tscharke RL, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc. Natl Acad. Sci. USA 2004; 101:17258-17263.
17. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol. 1990; 28:1642-1644.
18. Malik R, Wigney DI, Muir DB, Love DN. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. J Med. Vet. Mycol 1997; 35:27-31.
19. Montagna MT. A note on the isolation of *Cryptococcus neoformans* serotype A MATa strain from the Italian environment. Med Mycology 2002; 40:593-595.
20. Pal M. First report of isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Katmandú, Nepal. Rev. Iberoam. Micol 1997; 14:181-183.
21. Bustamante Rufino B, Swine D. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en dos pacientes peruanos. Rev Iberoam Micol 1998; 15:22-24.
22. Torres-Rodríguez JM, Baró T, Morera Y, Aliá C, López O, de Hermoso de Mendoza M. Caracterización molecular de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* causante de brotes epidémicos de criptococosis en cabras. Rev. Iberoam Micol 1999; 16:164-165.
23. Randhawa HS; Kowshik T; Khan Z. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. Med Mycol 2003; 41:199-209.
24. Gugnani HC, Mitchell TG, Litvintseva AP, Legeler KB, Heitman J, Kumar A, Basu A, Paliwal-Joshi A. Isolation of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from the flowers and bark of eucaliptos trees in India. Med Mycol 2005; 43:565-569.
25. Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Howard DH. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol. 1977; 105:582-586.
26. Boddy L, Frankland JC, West PV, eds. Ecology of saprotrophic basidiomycetes. British Mycological Society Symposium Series. 1st ed. London: Elsevier/ Academic Press. 2008.
27. Lazera MS, Cavalcanti MA, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. Med Mycol. 1998; 36:119-122.
28. Randhawa HS, Mussa AY, Khan ZU. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. Mycopathologia. 2001; 151:63-69.
29. Springer DJ, Chaturvedi V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. Emerg Infect Dis. 2010; 16:14-20.
30. Negroni R. Cryptococcosis. Clinics in Dermatology. 2012; 30:599-609.
31. Negroni R, Arechavala A, Robles AM, Bianchi M, Bava A, Helou S. Revisión

- clínica y evolución terapéutica de pacientes con criptococosis asociada al SIDA. Rev. Iberoam Micol 1995; 12:12-15.
32. Pal, M, Mehrotra BS. Studies on the efficacy of sunflower seed agar for the isolation and identification of *Cryptococcus neoformans*. Arogya- J. Health Sci. 1982; 8:74-79.
 33. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. Lancet. 1990; 366:923-925.
 34. Kwon-Chung KJ, Bennett J. Distribution of alpha and alpha mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. Am J Epidemiol. 1978; 4:337-339.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR RÁPIDO DEL COMPLEJO BURKHOLDERIA CEPACIA EN PACIENTES FIBROQUÍSTICO

Daniela Centrón

Depto de Microbiología, Inmunología y Parasitología de la Facultad de Medicina de
la Universidad de Buenos Aires

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DEL GEN RECA DIRECTAMENTE A PARTIR DE ESPUTO DE PACIENTES CON FQ.

Se recibieron 170 muestras clínicas en el Laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, las cuales fueron analizadas por PCR con los cebadores Bur3 y Bur4 siguiendo el algoritmo desarrollado anteriormente. Se obtuvo la amplificación del gen *recA* en 97 muestras clínicas, luego de la extracción del material genético bacteriano a partir de la muestra clínica. Cabe resaltar, que de rutina se solicitaron tres muestras de esputo seriadas recogidas por la mañana, previa higienización bucal y posterior recolección en frascos estériles de boca ancha. Se trabajaron con las 3 muestras seriadas de manera independiente desde la extracción de ADN total hasta la realización de la amplificación por PCR. En el 88% de los casos, fue PCR positivo en las 3 muestras seriadas, en el 2,4% de los casos fue PCR positiva en 2 de las 3 muestras de esputo y en el 1% de los pacientes analizados se identificó como positivo por PCR 1 de las 3 muestras seriadas remitidas al laboratorio. Estos resultados reflejan la importancia de un mínimo número de 3 muestras seriadas por paciente para aumentar la probabilidad de recuperación, demostrando la heterogeneidad de las comunidades bacterianas residentes en el pulmón de estos pacientes. La secuenciación de los 97 amplicones generados en este algoritmo diagnóstico, reveló que el 72% de los mismos correspondían a diferentes especies genéticas del CBC, mientras que el 28% eran *B. no cultivable* (N=8) y *Burkholderia* spp. (N=19), no pertenientes al CBC (Tabla 1).

Con respecto a la distribución entre países, en Argentina se observó en orden decreciente *B. multivorans* 13/49 (28%); *B. cepacia* 7/49 (15%), *B. cenocepacia* 6/49 (13%), *B. contaminans* 5/49 (11%), *B. vietnamiensis* 4/49 (9%) y *B. stabilis* 2/49 (4%). Con respecto a las cepas identificadas como no

pertenecientes al CBC, la frecuencia de aislamiento fue para *Burkholderia* spp. 9/43 (21%) y para *Burkholderia* no cultivable 3/49 (7%). Por su parte, en Brasil (N=46) se identificó *B. cenocepacia* (33%), *B. multivorans* 7/46 (15%), *B. contaminans* 4/46 (9%), *B. cepacia* 2/46 (4%) y *B. vietnamiensis* 2/46 (4%). Y con respecto a las cepas no pertenecientes al CBC: *Burkholderia* spp. 10/46 (24%) y *B.* no cultivable 5/46 (11%).

Tabla 1. Resultados obtenidos de la secuenciación de las 97 amplicones.

Especies genéticas del CBC por PCR/secuenciación	Número de muestras
<i>B cenocepacia</i>	24 (23%)
<i>B. multivorans</i>	20 (21%)
<i>B. cepacia</i>	9 (10%)
<i>B. contaminans</i>	9 (10%)
<i>B. vietnamiensis</i>	6 (6.5%)
<i>B. stabilis</i>	2 (2%)
Especies no pertenecientes al CBC por PCR/secuenciación	Número de muestras
<i>Burkholderia no cultivable</i>	8 (9%)
<i>Burkholderia</i> spp	19 (19%)

En conclusión, los cebadores Bur3 y Bur4 del gen *recA* permitieron detectar la presencia de bacterias del complejo CBC con alta especificidad y sensibilidad para posteriormente por secuenciación asignarle la especie genética correspondiente. La secuencia contribuyó a simplificar el análisis y a reducir los costos (internación, medicación, etc.), y en perspectiva se prefiere el método basado en la secuencia de genes por sobre otras metodologías.

PRESENCIA DE *RICKETTSIA MASSILIAE* Y *ANAPLASMA PLATYS* EN GARRAPATAS Y CANINOS DOMÉSTICOS DE LA CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES Y EL MUNICIPIO DE BAHÍA BLANCA.

Gabriel Cicuttin^{1†}, Diego Brambatti¹, Juan Rodríguez¹, Cecilia González Lebrero¹, Pablo Vidal², Nazarena De Salvo¹, Fernando Beltrán^{1‡}, Federico Gury Dohmen¹, Isabel Jado García^{3‡}, Pedro Anda³

(1) Sección Serología y Pruebas Biológicas – Instituto de Zoonosis Luis Pasteur (Ministerio de Salud – GCABA);² Dirección de Zoonosis – Municipalidad de Bahía Blanca;³ Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales – Instituto de Salud Carlos III (España)

†: Investigador principal. ‡: Investigadores asociados en este subsidio.

INTRODUCCIÓN

Las rickettsiosis, ehrlichiosis y anaplasmosis son consideradas el paradigma de las enfermedades emergentes debido al incremento en su incidencia y a su expansión geográfica¹⁻⁴, forman un grupo de enfermedades zoonóticas cuya severidad en el hombre varía desde formas benignas y autolimitadas a infecciones fulminantes de elevada mortalidad. La familia Rickettsiaceae, género *Rickettsia* se compone de tres grupos^{5,6}. El grupo de las fiebres manchadas (entre las que encontramos a *R. rickettsii* -Fiebre de las Montañas Rocosas-, *R. conorii* -Fiebre Exantémica Mediterránea-) son transmitidas por garrapatas ixódidas (garrapatas duras). El grupo de las fiebres tíficas (*R. typhi* y *R. prowaseckii*), transmitidas por pulgas y piojos respectivamente. Y por último, el grupo de *R. bellii*. Son bacterias gram-negativas intracelulares obligatorias, muchos animales (mamíferos y aves) son susceptibles a las infecciones y desarrollan bacteremias de distinta duración y signología clínica, quedando aún por determinar el rol que juegan como reservorios. El número de especies de *Rickettsia* asociadas con enfermedad humana se encuentra en progresión constante^{1,2,4,6}. La familia Anaplasmataceae se divide en tres géneros⁵. El género *Anaplasma*, que incluye a *A. phagocytophila* (*E. phagocytophila*) -Ehrlichiosis granulocítica humana- y *A. platys* (*E. platys*) -Trombocitopenia cíclica infecciosa canina-, entre otras. El género *Ehrlichia*: *E. chaffeensis* -Ehrlichiosis monocítica

humana- y *E. canis* -Ehrlichiosis monocítica canina-. Y el género *Neorickettsia*: *N. sennetsu* (*E. sennetsu*) -Fiebre Sennetsu-, *N. risticii* (*E. risticii*) -Ehrlichiosis monocítica equina- y *N. helminthoeca* -Toxipatía canina por salmón-. Son bacterias pequeñas, gram-negativas, pleomórficas, intracelulares obligatorias. Las enfermedades que producen, tradicionalmente han sido categorizadas (y nombradas) por el tipo de célula sanguínea que infectan. Estos agentes se mantienen en hospedadores silvestres a través de picaduras de garrapatas (excepto el género *Neorickettsia* que es transmitido por trematodes), los animales domésticos (como el perro) son hospedadores accidentales y a veces reservorios⁷.

En Argentina hay pocos datos sobre estas enfermedades, su real incidencia sobre la población humana y animal, y el grado de infección en las distintas especies de garrapatas. La primera notificación fue en 1993-1994, en Jujuy, donde se detectaron 6 casos pediátricos debido a *R. rickettsii* y *E. chafeensis*^{8,9}. En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Cicuttin y col., en 2004, detectaron *R. massiliae* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y seropositividad a *Rickettsia* spp. en sueros de caninos pertenecientes a barrios carenciados¹⁰. La detección de anticuerpos contra *Rickettsia* spp. en perros se ha propuesto como un posible indicador de riesgo de transmisión a humanos¹¹. Recientemente se ha descrito un caso humano procedente de Buenos Aires¹². En cuanto al vector, estudios realizados sobre el complejo *Rh. sanguineus*, indican que existen diferentes especies en América, siendo probablemente en Argentina y Uruguay introducidas desde Europa, mientras que en Brasil, Paraguay, Perú y Centroamérica procedentes desde África^{13,14}. En los años siguientes se detectaron casos humanos en el Delta del Paraná y en la Bahía Samborombón (Buenos Aires), debidos a *R. parkeri*. También otras rickettsias y ehrlichias fueron halladas en distintas especies de garrapatas, en Jujuy, Córdoba y Buenos Aires¹⁵⁻²⁰. En el año 2008, Cicuttin y col. detectaron *A. platys* en caninos de la CABA²¹. Este agente también fue detectado en garrapatas del complejo *Rh. sanguineus* de Corrientes²².

La escasa información sobre la presencia de estos patógenos en CABA y especialmente en Bahía Blanca, así como los antecedentes de picaduras de garrapatas (y sus consecuencias) en humanos de estos ámbitos²³, plantearon la necesidad de comenzar con este estudio, con el objetivo de detectar rickettsias, ehrlichias y anaplasmas circulantes en garrapatas y caninos domésticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Desde Octubre de 2009 a Abril de 2010 se muestrearon garrapatas junto con sangre entera de 38 caninos domésticos de la CABA y 28 de Bahía Blanca, durante las actividades de esterilizaciones quirúrgicas. En la CABA provenían de barrios carenciados de los Centros de Salud N° 24, 18 y 14 y en Bahía Blanca de barrios de las delegaciones municipales Centro, Las Villas, Noroeste, Norte y Villa Rosas. En total se recolectaron 70 garrapatas (40 ninfas y 30 adultos) de CABA y 40 (15 ninfas y 25 adultos) de Bahía Blanca, identificadas como pertenecientes a la especie *Rhipicephalus sanguineus*. Las muestras fueron conservadas a -70° C.

Extracción de ácidos nucleicos

El ADN se extrajo de las muestras sanguíneas mediante columnas de extracción (Axyprep Blood Genomic DNA Miniprep – Axygen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las garrapatas fueron resuspendidas en buffer Tris-EDTA, luego seccionadas con hoja de bisturí y maceradas. Luego el ADN se extrajo mediante el método del tiocianato de guanidina²⁴. Las ninfas fueron procesadas en pools de 5 ejemplares.

Como control negativo de extracción se utilizó agua libre de nucleasas.

Amplificación

Para la detección de *Ehrlichia* spp. / *Anaplasma* spp. se usó primers específicos para el gen 16S rRNA, según la metodología descrita²⁵. Como control positivo se utilizó *A. bovis* provisto por el Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales (EPE-CNM, Instituto de Salud Carlos III, España). Para la detección de *Anaplasma platys* se utilizó primers específicos para el gen 16S rRNA de esa especie²⁵. La amplificación del género *Rickettsia* spp. fue realizada con primers para el espacio intergénico 23S-5S rRNA²⁶. Como control positivo se utilizó un plásmido clon 4 de *Rickettsia conorii* también cedido por el EPE-CNM. Como controles negativos se utilizó agua libre de nucleasas. Los productos resultantes fueron analizados por visualización en un gel de agarosa.

Secuenciación de los productos positivos

Los productos positivos a secuenciar fueron purificados desde el gel de agarosa mediante columnas de extracción (QIAquick Gel Extraction Kit - Qia-

gen) y secuenciados por el Servicio de Neurovirosis, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS Dr. Malbrán. Para la reacción de secuenciación se utilizó el kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction (PE Biosystems), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Mediante el software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), la secuencia fue comparada con las secuencias existentes en el GenBank.

RESULTADOS

Caninos domésticos

En 4 caninos domésticos de la CABA se detectó positividad a *Ehrlichia* spp. / *Anaplasma* spp. A estos 4 positivos se les realizó la PCR específica para *A. platys*, resultando todos positivos. Todos los caninos resultaron negativos para *Rickettsia* spp.

De los caninos de Bahía Blanca, 11 fueron positivos a *Ehrlichia* spp. / *Anaplasma* spp. A esos 11 positivos se les realizó la PCR específica para *A. platys*, resultando todos positivos. Todos fueron negativos para *Rickettsia* spp.

Los 4 positivos a *Ehrlichia* spp. / *Anaplasma* spp. procedentes de CABA fueron secuenciados, arrojando un 100% de homología con *Anaplasma platys* (JF683610.1).

De las 11 muestras positivas a *A. platys* procedentes de Bahía Blanca, se seleccionaron 3 al azar para su secuenciación. Los resultados de la secuenciación demostraron un 100% de homología con *Anaplasma platys* (JF683610.1).

Garrapatas *Rh. sanguineus*

En 10 garrapatas *Rh. sanguineus* recolectadas de la CABA se detectó *Rickettsia* spp. Estas dos muestras positivas eran pooles de 5 ninfas. Todas resultaron negativas a *Ehrlichia* spp. / *Anaplasma* spp. Los ejemplares de Bahía Blanca resultaron negativos para ambas PCRs.

Los 2 pooles positivos fueron secuenciados. La comparación resultó en un 100% de homología con *Rickettsia* sp. Bar29 (*R. massiliae* Bar29) (AY125014.1) y 99% con *Rickettsia massiliae* MTU5 (CP000683.1).

Resumen de los resultados obtenidos

		Total	<i>Rickettsia</i> spp.		<i>Ehrlichia</i> spp. / <i>Anaplasma</i> spp.		<i>Anaplasma platys</i>	
		n	n	%	n	%	n	%
Caninos domésticos	CABA	38	0	0	4	10,5	4	100
	Bahía Blanca	28	0	0	11	39,3	11	100
	Subtotal	66	0	0	15	22,7	15	100
Garrapatas <i>Rh. sanguineus</i>	CABA	70	10 (2 pooles)	14,3	0	0	-	-
	Bahía Blanca	40	0	0	0	0	-	-
	Subtotal	110	10	9,1	0	0	-	-
Total		176	10	-	15	-	-	-

DISCUSIÓN

Según nuestro conocimiento de la bibliografía, para Argentina, estas son las primeras secuencias obtenidas de *A. platys* procedentes de caninos y la segunda detección de *R. massiliae* en garrapatas del complejo *Rh. sanguineus*. Ambos patógenos hallados son transmitidos por garrapatas del complejo *Rh. sanguineus* y los perros son considerados reservorios (especialmente en el caso de *A. platys*).

R. massiliae, rickettsia del grupo de las fiebres manchadas, se encuentra distribuida en el mundo, asociada a garrapatas del género *Rhipicephalus*²⁷. Sólo se han confirmado 3 casos de enfermedad humana (uno de los cuales es un paciente procedente de Buenos Aires) debida a este patógeno, pero se considera que numerosos casos humanos diagnosticados como debidos a *R. conorii* en Europa, fueron ocasionados por este agente¹². Distintos estudios serológicos en humanos revelan una alta seropositividad a *R. massiliae*^{12,28}. En caninos domésticos, *R. massiliae* podría causar enfermedad, con signos similares a otras rickettsiosis (*R. rickettsii* y *R. conorii*), ya que ha sido sospechada por serología y positividad en garrapatas de perros con signología compatible. Las rickettsemias en perros son de corta duración y difíciles de detectar²⁷. Los niveles de positividad en garrapatas son muy variables, de un 2,5 a 18% en España²⁹⁻³¹, 2,5% en Grecia³², 5-6% en África³³⁻³⁴, 25% en

Israel³⁵, más del 25% en Estados Unidos^{28,36}, 20% en CABA¹⁰, entre otros y 14,3% en el presente estudio. Esto se encuentra relacionado con la cantidad y tipo población de garrapatas estudiadas, los hospedadores de donde fueron recolectadas las mismas, las distintas especies de garrapatas agrupadas bajo el nombre *Rh. sanguineus* y los métodos de diagnóstico utilizados. La no detección de este patógeno en las garrapatas de Bahía Blanca podría atribuirse al bajo número de muestras analizadas.

A. platys es el agente causante de la trombocitopenia cíclica infecciosa canina, que resulta generalmente leve, cursando en ocasiones de forma subclínica, si bien puede producir fiebre, anorexia, petequias y uveítis³⁷⁻³⁸. Los distintos niveles de positividad hallados para cada localidad en nuestra investigación son también observados en otros estudios realizados, desde un 19% en el Caribe, 16% en Venezuela y Brasil (aunque con desigual distribución según la región del país), 20% en Chile, 33% en Argentina, hasta un 6-9% en España y 4% en Italia^{24,39-42}. Estas variaciones generalmente están relacionadas con la población canina estudiada (cantidad y calidad), los niveles de infestación por garrapatas y el método diagnóstico utilizado^{38,42}. En garrapatas *Rh. sanguineus*, *A. platys* fue encontrada en pocas oportunidades, con un bajo nivel de positividad^{25,43}. En Argentina, fue detectada en *Rh. sanguineus* de un área urbana de Corrientes²². En cuanto al rol zoonótico de *A. platys*, los datos de estudios actuales disponibles no son concluyentes. En Venezuela, se han encontrado ehrlichias en plaquetas de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, pero no se ha identificado de forma fehaciente el agente implicado⁴⁴.

Las garrapatas del complejo *Rh. sanguineus* pican más frecuentemente a los humanos de lo que se suele encontrar en la bibliografía²⁴, incluso se han encontrado pacientes con infestaciones elevadas⁴⁵ y aumento de picaduras por altas temperaturas⁴⁶. Además en zonas de climas templados, se pueden establecer dentro de las casas, permaneciendo activas durante todo el año⁴⁷. Las personas de bajos recursos son especialmente susceptibles^{24,48}. Los perros son una fuente potencial de infecciones porque llevan garrapatas infectadas hacia ambientes no endémicos y hacia ambientes domiciliarios, y, además, la remoción manual de garrapatas representa un gran riesgo de contagio. El control de las garrapatas en caninos domésticos debe ser frecuente y regular, debiéndose tratar también al ambiente^{28,47}.

El conocimiento de los patógenos detectados en este estudio, que están circulando por las poblaciones de perros y garrapatas, es fundamental para su correcto diagnóstico, más aún en barrios carenciados, donde el ciclo de

transmisión garrapata-hombre está facilitado por un contacto íntimo en un entorno de malas condiciones de salubridad. Los veterinarios y los médicos deberían tener presente la importancia de las enfermedades transmitidas por garrapatas en Argentina, para que una picadura de garrapatas en una persona no quede como un hecho anecdótico y tenga el seguimiento clínico que amerita.

ABSTRACT

Rickettsioses, ehrlichioses and anaplasmoses are a group of zoonotic diseases that are considered the paradigm of emerging diseases due to increase in incidence and geographic expansion. Seropositivity to *Rickettsia* spp. in dogs, *R. massiliae* in ticks *Rhipicephalus sanguineus* and *A. platys* in dogs was detected in Buenos Aires. Recently, a human case was diagnosed from Buenos Aires due to *R. massiliae*. In Bahia Blanca there are no data records of these pathogens.

In order to detect these pathogens, blood samples and ticks *Rh. sanguineus* was obtained from pet dogs in Buenos Aires and Bahia Blanca. PCR was used for detection of the genera *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. (gene 16S rRNA), *Anaplasma platys* (gene 16S rRNA) and the genus *Rickettsia* spp. (intergenic spacer 23S-5S rRNA).

The *Ehrlichia* spp. / *Anaplasma* spp. PCR resulted in the expected DNA band in 4/38 dogs from Buenos Aires and 11/28 from Bahia Blanca (being also positive for *A. platys*) and identified *A. platys* by sequencing analysis. In 10/70 ticks *Rh. sanguineus* (2 pools of 5 nymphs) from Buenos Aires was detected *Rickettsia* spp. and sequences obtained were similar to *Rickettsia* sp. Bar29 (*R. massiliae* Bar29).

Pathogens found in this study are transmitted by ticks of the complex *Rh. sanguineus*, are distributed around the world and dogs are considered reservoirs (mainly in the case of *A. platys*). *R. massiliae* is a proven human pathogen, while the zoonotic role of *A. platys* has not yet been clarified. The knowledge of these pathogens for the populations of dogs and ticks are essential for correct diagnosis in human, especially in poor neighborhoods, where the cycle of tick-men transmission is facilitated by close contact in an environment of poor conditions sanitation.

BIBLIOGRAFÍA

1. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 694-719. 1997.
2. Olson J, Paddock C. Emerging rickettsioses. *The Infectious Disease Review.* 1(2):113-114. 1999.
3. Comer J, Paddock C, Childs J. Urban zoonoses caused by *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* species. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 1(2):91-118. 2001.
4. Parola P, Raoult D. Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases.* 32: 897-928. 2001.
5. Dumler S, Barbet A, Bekker C, Dasch G, Palmer G, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51: 2145-2165. 2001.
6. Brouqui P, Parola P, Fournier P, Raoult D. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *Immunol Med Microbiol.* 49: 2-12. 2007.
7. Rikihisa Y. The Tribe Ehrlichieae and Ehrlichial Diseases. *Clinical microbiology reviews.* Vol. 4 N° 3, p. 286-308. 1991.
8. Ripoll C, Remondegui C, Ordonez G, Arazamendi R, Fusaro, et al. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(2): 350-354. 1999.
9. Paddock C, Fernandez S, Echenique G, Sumner J, Reeves W, Zaki S, Remondegui C. Rocky Mountain Spotted Fever in Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78⁴, pp. 687-692. 2008.
10. Cicuttin, G., Rodríguez Vargas, M., Jado, I., Anda, P. Primera detección de *Rickettsia massiliae* en la Ciudad de Buenos Aires (Comunicación preliminar). *Rev. Arg. de Zoonosis.* Vol I N° 1: 8-10. 2004.
11. Mannelli A., Mandola M., Pedri P., Tripoli M., Nebbia P. Associations between dogs that were serologically positive for *Rickettsia conorii* relative to the residences of two human cases of Mediterranean spotted fever in Piemonte (Italy). *Preventive Veterinary Medicine* 60. 13-26. 2003.
12. García García J, Portillo A, Núñez M, Santibáñez S, Castro B, Oteo J. A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. *Am J Trop Med Hyg.* 82(4):691-2. 2010.
13. Moraes Filho J, Marcili A, Nieri Bastos L, Richtzenhain L, Labruna M. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Tropica* 117: 51-55. 2011.
14. Nava S, Guglielmone A, Mangold A. An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience* 14: 2857-2877. 2009.
15. Pacheco R, Moraes Filho J, Nava S, Brandao P, Richtzenhain L, Labruna M. Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Experimental and Applied Acarology.* Vol. 43, No.

- 1, pp. 63-71. 2007.
16. Labruna M, Pacheco R, Nava S, Brandao P, Richtzenhain L, Guglielmone A. Infection by *Rickettsia bellii* and Candidatus "*Rickettsia amblyommii*" in *Amblyomma neumanni* Ticks from Argentina. Microbiol Ecology. 54(1):126-133. 2007.
 17. Nava S, Elshenawy Y, Ereemeeva M, Sumner J, Mastropaolo M, Paddock C. *Rickettsia parkeri* in Argentina. Emerg Infect Dis. 14(12):1894-7. 2008.
 18. Tomassone L, Nuñez P, Gürtler R, Ceballos L, Orozco M et al. Molecular Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in *Amblyomma parvum* Ticks, Argentina. Emerg Infect Dis. 14(12): 1953-1955. 2008.
 19. Venzal J, Nava S. El género *Rickettsia* como agente de zoonosis en el Cono Sur de Sudamérica. Rev Med Urug 27: 98-106. 2011.
 20. Labruna M, Mattar S, Nava S, Bermudez S, Venzal J et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. Rev MVZ Córdoba 16(2): 2435-2457. 2011.
 21. Cicuttin G, Navarro O'Connor M, Lobo B, Jado I, Anda P. Evidencia molecular de *Anaplasma platys* en caninos domésticos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. En prensa. 2012.
 22. Oscherov E, Milano A, Lobo B, Anda P, Escudero R. Detection of *Anaplasma platys* and other pathogens in ectoparasites from urban hosts in Northeast Argentina. Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. 70¹: 42-48. 2011.
 23. Cicuttin G, Brambati D, Rodríguez Eugui J, González Lebrero C, De Salvo N, Vidal P, Gury Dohmen F. Garrapatas duras (familia Ixodidae) en caninos domésticos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y del municipio de Bahía Blanca, Argentina. Póster. 2do Encuentro Nacional sobre Enfermedades Olvidadas y XIV Simposio Internacional sobre Control Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores. 2011.
 24. Casas I., Powell L., Klapper P., Cleator G. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. J. Virol. Meth. 53: 25-36. 1995.
 25. Inokuma H, Raoult D, Brouqui P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in Brown Dogs Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. Journal of Clinical Microbiology. 38(11): 4219-21. 2000.
 26. Jado I, Escudero R, Gil H, Jiménez-Alonso M, Sousa R et al. Molecular Method for Identification of *Rickettsia* Species in Clinical and Environmental Samples. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 44, N° 12, p. 4572-4576. 2006.
 27. Beeler E, Abaramowicz K, Zambrano M, Sturgeon M, Khalaf N et al. A Focus of Dogs and *Rickettsia massiliae*-Infected *Rhipicephalus sanguineus* in California. Am J Trop Med Hyg. 84(2): 244-9. 2011.
 28. Cardeñosa N, Segura F, Raoult D. Serosurvey among Mediterranean spotted fever patients of a new spotted fever group rickettsial strain (Bar29). Eur J Epidemiol. 18(4):351-6. 2003.
 29. Oteo JA, Portillo A, Santibáñez S, Pérez-Martínez L, Blanco JR et al. Prevalence of spotted fever group Rickettsia species detected in ticks in La Rioja, Spain. Ann N Y Acad Sci. 1078:320-3. 2006.
 30. Márquez FJ, Rodríguez-Liébaña JJ, Soriguer RC, Muniaín MA, Bernabeu-Wit-

- tel M, Caruz A, Contreras-Chova F. Spotted fever group *Rickettsia* in brown dog ticks *Rhipicephalus sanguineus* in southwestern Spain. *Parasitol Res.* 103(1):119-22. 2008.
31. Márquez FJ. Spotted fever group *Rickettsia* in ticks from southeastern Spain natural parks. *Exp Appl Acarol.* 45(3-4):185-94. 2008.
 32. Psaroulaki A, Spyridaki I, Ioannidis A, Babalis T, Gikas A, Tselentis Y. First Isolation and Identification of *Rickettsia conorii* from Ticks Collected in the Region of Fokida in Central Greece. *J Clin Microb.* 41(7): 3317-9. 2003.
 33. Sarih M, Socolovschi C, Najma. Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Ticks, Morocco. *Emerging Infectious Diseases.* 14(7): 1067-73. 2008.
 34. Khaldi M, Socolovschi C, Benyettou M, Barech G, Biche M et al. *Rickettsiae* in arthropods collected from the North African Hedgehog (*Atelerix algirus*) and the desert hedgehog (*Paraechinus aethiopicus*) in Algeria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012.
 35. Harrus S, Perlman-Avrahami A, Mumcuoglu KY, Morick D, Baneth G. Molecular detection of *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia sibirica mongolitimonae* and *Rickettsia conorii israelensis* in ticks from Israel. *Clin Microbiol Infect.* 17(2):176-80. 2011.
 36. Ereemeeva M, Bosserman E, Demma L, Zambrano M, Blau M et al. Isolation and Identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* Ticks Collected in Arizona. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(8):5569-77. 2006.
 37. Abarca K, López J, Perret C, Guerrero J, Godoy P et al. *Anaplasma platys* in Dogs, Chile. *Emerging Infectious Diseases.* 13⁹: 1392-5. 2007.
 38. Santos F, Coppede J, Pereira A, Oliveira L, Roberto P et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Vet J.* 179¹: 145-8. 2009.
 39. Dagnone A, Souza A, André M, Machado R. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. *Rev Bras Parasitol Vet.* 18⁴: 20-5. 2009.
 40. De La Fuente J, Torina A, Naranjo V, Nicosia S et al. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Vet Res.* 2:24. 2006.
 41. Ramos C, Ramos R, Araujo F, Guedes D, Souza I et al. Comparison of nested-PCR with blood smear examination in detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs. *Rev Bras Parasitol Vet.* 18 Suppl 1: 58-62. 2009.
 42. Solano Gallego L, Llull J, Osso M, Hegarty B, Breitschwerdt E. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet Res.* 37²: 231-44. 2006.
 43. Sanogo Y, Davoust B, Inokuma H, Camicas J, Parola P et al. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. *Onderstepoort J Vet Res.* 70:205-12. 2003
 44. Tamí I, Tamí Maury I. Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. *Rev Panam Salud Publica.* 16⁵: 345-9. 2004.
 45. Demma L, Traeger M, Nicholson W, Paddock C, Blau D et al. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N Engl J Med* 353: 587-94. 2005.

46. Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier P-E, Sotto A et al.. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. PLoS Negl Trop Dis 2: e338-e338. 2008.
47. Uspensky I, Ioffe-Uspensky I. The dog factor in brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) infestations in and near human dwellings. Int J Med Microbiol 291 (Suppl 33): 156-63. 2002.
48. Brouqui P, Raoult D. Arthropod-borne diseases in homeless. Ann N Y Acad Sci 1078: 223-235. 2006.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EN LA POBLACIÓN INFANTIL CON FACTORES DE RIESGO DE ABUSO SEXUAL

Cecilia Gabriela Cuffini, Ximena Kiguen; Jorge Luis Kiguen;
Patricia Montanaro; María Celia Frutos; Fernando Venezuela;
Carlos Eduardo Alonso

²Cátedra de Epidemiología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
UNL, Argentina

INTRODUCCIÓN

La *Chlamydia trachomatis* (*C.trachomatis*) es una bacteria que se transmite especialmente por contacto sexual o secreciones genitales infectadas. Produce un gran porcentaje de infecciones asintomáticas en adultos sexualmente activos lo que complica su diagnóstico precoz y mantiene la infección en la población. En el 2008, nuestros resultados⁶ aportaron datos de la prevalencia de *C.trachomatis* (8,7% infectados) en jóvenes adolescentes sexualmente activos asintomáticos de la ciudad de Córdoba; optimizamos una técnica de biología molecular altamente sensible y específica sobre una muestra no invasiva como la orina. El hallazgo más importante fue que la población femenina y de condición socioeconómica desfavorable resultó ser la más susceptible a la infección por *C.trachomatis*. El genotipo E de *C.trachomatis* resultó ser el más prevalente⁵.

C.trachomatis infecta con mayor facilidad el cuello uterino inmaduro, haciendo que las mujeres adolescentes sean más susceptibles a la infección⁶. Los cuadros clínicos que provoca la infección por esta bacteria en adultos son: uretritis, cervicitis, Enfermedad Inflamatoria Pélvica, epididimitis y conjuntivitis de inclusión entre otros¹⁹.

La detección de *C.trachomatis* y el tratamiento temprano de esta infección de transmisión sexual (ITS) pueden evitar complicaciones más graves, incluyendo infertilidad, embarazos ectópicos y la transmisión perinatal al neonato, el cual puede desarrollar neumonías atípicas y conjuntivitis¹². Esta infección perinatal puede persistir en el niño hasta los 3 años de edad⁸; en algunos casos con una presentación asintomática. El niño puede infectarse por la vía perinatal y por contacto sexual.

La incidencia real del abuso sexual (AS) es desconocida. Se considera que es una de las formas de maltrato con mayor subregistro debido al secreto o “conspiración para el silencio” que tan frecuentemente rodea estos casos. El National Center on Child Abuse and Neglect (NCCAN) estima que la incidencia anual de AS en Estados Unidos es más de 75.000 casos por año^{13,20}. En nuestro país podemos observar que, según las cifras presentadas por el Hospital Pedro de Elizalde, el maltrato infantil creció entre los años 1988 y 1991, el 18% de los casos de maltrato correspondía a AS, esta cifra trepó al 41% en el período 1992/93. Es importante destacar que solo el 4% de los pacientes examinados por sospecha de abuso sexual (SAS), tiene anormalidades en el examen físico; el resto no presenta ningún hallazgo físico compatible.^{7,10} El AS afecta más a las niñas (80%), aunque los niños (20%) también lo sufren.^{1,3}

El AS suele acompañarse por trastorno de conducta del niño y/o con las manifestaciones clínicas específicas como lesiones genitales, fisuras o laceraciones rectales, inclusive ITS. La mayoría de los AS no incluye penetración (vaginal, anal, oral); sin embargo el contacto con secreciones genitales contaminadas puede transmitir la ITS; por ejemplo: *C.trachomatis*, *virus Papiloma humano (VPH)* o *virus Herpes*. La presencia de una ITS en un niño; mayor de 3 años de edad, siempre es considerado un índice de AS. Según la Academia Americana de Pediatría (AAP), el hallazgo de *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *HIV* o *C.trachomatis* es considerado diagnóstico de certeza de abuso sexual, mientras que la detección de *Trichomonas vaginalis*, *VPH* o *virus Herpes* sólo nos da sospecha del mismo³. La detección de *Mycoplasma genitalium (M.genitalium)* en muestras de niños es aún controversial; por lo que se planteó como objetivo adicional la detección del *VPH* y *M.genitalium*.

En base a lo anteriormente expuesto nos planteamos como Objetivo de nuestra investigación “Detectar *C. trachomatis* en muestras de niños con sospecha de abuso sexual (SAS) que concurren a la Unidad Judicial de la ciudad de Córdoba y compararla con la prevalencia de un grupo control”.

Centros de Salud, Población y Muestras

Se capacitó a los profesionales que obtuvieron las muestras de los pacientes pediátricos, mediante disertaciones sobre el Abuso sexual con especialistas. Se describieron los síntomas y signos de las ITS en niños, haciendo énfasis en *C.trachomatis*. Se explicaron los métodos diagnósticos que se optimizaron en el laboratorio para investigar esta infección bacteriana,

fijando un criterio unificado para la obtención de las muestras y la interpretación de los resultados.

Participaron profesionales de los siguientes centros de salud:

- Unidad Judicial de la mujer y el niño; donde realizan la denuncia y son asistidos judicialmente y contenidos psicológicamente.
- Hospital de Niños de la Santísima Trinidad” de la ciudad de Córdoba. Los niños son evaluados por los profesionales médicos, quienes son los responsables de completar la ficha, consentimiento y asentimiento; además de obtener las muestras de cada niño.
- Dispensario N°24 Cupani; se obtuvieron las muestras del grupo control.

El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas-UNC.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes entre 0 y 14 años de edad.

Pacientes con sospecha médica de abuso sexual (*clínica*: lesiones genitales u orales por ITS o traumas; *psicológica*: trastornos en la conducta).

Niños que asistían por controles o consultaban para el ingreso escolar, sin sospecha de abuso sexual, que voluntariamente participaban en el estudio completando la ficha, firmando el consentimiento y el asentimiento.

Se estudiaron muestras de hisopado faríngeo (HF) y muestras de orina. Esta última fue obtenida por micción espontánea de los primeros 10-20 ml de orina. La recolección se realizó en frasco estéril y se conservó a una temperatura de 4°C durante un plazo máximo de 4 días.

Grupo SAS: La Unidad Judicial solicitó el estudio de *C.trachomatis* en muestras de 54 niños; correspondientes a 13 varones y 41 niñas; con un rango etario de 2 a 13 años (Media: 8 años).

El panel de muestras fueron: 5 HF de 3 nenas y de 2 varones; 1 muestra de orina de 1 varón; 46 niños (36 nenas y 10 varones) entregaron una muestra de orina y del HF; y se recibieron las siguientes muestras que también fueron investigadas: 1 Hisopado uretral de 1 varón; 1 flujo vaginal de 1 nena.

No fueron obtenidas muestras genitales maternas para descartar transmisión perinatal, porque no se detectó la infección por *C.trachomatis* en niños de 0 a 3 años de edad.

Grupo Control: Se estudiaron muestras de 21 niños; con un rango etario de 0,6 a 9 años (Media: 2 años).

El panel de muestras fueron 21 HF y 3 orinas.

MÉTODOS

Extracción de Ac. Nucleicos: Se realizó una extracción de ADN genómico utilizando AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer) a partir de las muestras obtenidas.

Detección de *C.trachomatis*: Utilizamos una Hemi Nested PCR con los cebadores A1/A2/pCTM3 y una PCR con los cebadores CTP1/CTP2 dirigidos contra los genes que codifican la proteína mayor de la membrana externa (MOMP) y el plásmido críptico, respectivamente^{4,5}.

Visualización de los productos de PCR: Los productos de PCR se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa. Las bandas correspondientes al producto esperado fueron extraídas del gel empleando el Kit QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen, Valencia, Ca, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Genotipificación de las cepas de *C.trachomatis*: El genotipo se determinó por el Estudio del Polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP). Se utilizaron las enzimas de restricción AluI, HinfI, EcoRI y DdeI. Los fragmentos resultantes se compararon con un patrón de peso molecular y la identificación de los genotipos se realizó evaluando el perfil electroforético²¹.

Detección del VPH: Se realizó mediante PCR usando los cebadores MY11 y MY09 que amplifican un fragmento de 450 pb de la región conservada L1

del virus. La genotipificación del VPH se realizó por RFLP con 7 enzimas de restricción².

Detección de *M.genitalium*: La identificación se realizó utilizando los cebadores MgPa1 y MgPa3. Los mismos fueron elegidos para amplificar un fragmento de 281 pares de bases correspondientes al gen de la adhesina solo presente en esta especie de *Mycoplasma*¹¹.

Análisis de las Secuencias: Se alinearán las secuencias de ADN empleando el programa Clustal X. Las secuencias serán utilizadas para genotipificación por métodos filogenético [o utilizando la herramienta de genotipificación viral del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>)]. El análisis filogenético se realizará utilizando el Programa MEGA 3¹⁴ empleando la metodología de Neighbor Joining y se evaluarán por la técnica de Bootstrap.

Análisis estadístico: Las variables continuas serán analizadas por test de Student. Las variables categóricas mediante el test X². Para el estudio de asociación de riesgo (odds ratio) y estratificación se utilizarán los análisis de regresión logística uni y multivariado. En todos los casos la significancia estadística se establecerá a un $p < 0,05$. Se utilizará el paquete estadístico STATISTIC versión 6.0 (2300 EAST 14 th street, Tulsa, OK, USA, 2005) para Windows de Statsoft.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudiaron 75 niños en total, pertenecientes 54 al grupo SAS y 21 al grupo control. La prevalencia global de *C.trachomatis* fue del 13,3% (10/75). En la Tabla N°1 se observa que las niñas presentaron una mayor frecuencia de la infección (16%) que los varones (8%); resultados similares a los reportados por otros autores^{3,10}. Asimismo se observó que los niños en el rango etario de 6-10 años tenían más riesgo (2 veces más) de contraer la infección por *C.trachomatis* que los niños de 0-5 años o mayores de 10 años.

Podemos resaltar que los niños con SAS exhibieron 4 veces más probabilidades de contraer *C.trachomatis* que los niños del grupo control.

Tabla 1: Evaluación de las variables relacionadas con la infección por *C.trachomatis*

Características	total población	% positivos (n)	valor de p	OR (IC95%)
Sexo				
Femenino	50	16 ⁸	0,34	2,19 (0,38-16,38)
Masculino	25	8 ²	0,33	0,46 (0,06-2,45)
Grupo				
SAS	54	16,6 ⁹	0,17	4 (0,46-89,93)
control	21	4,76 ¹	0,32	0,25 (0,01-2,19)

Además, nuestros resultados señalaron que las niñas del grupo SAS tenían casi 3 veces más riesgo (OR: 2,91 03.3-68.57) de contraer la infección que los varones del mismo grupo. En relación a este grupo; se detectó *C.trachomatis* en 10 muestras (16,7%); correspondientes a 7 HF y 3 orinas; de 8 nenas y 1 varón (9niños/54). Mientras que autores como Muñoz y col detectaron *C.trachomatis* en el 3% de muestras pediátricas con SAS¹⁷; algunas publicaciones reportan que el riesgo de adquirir esta ITS durante un asalto sexual es 4% al 17%¹⁸. Consideramos que al realizar la investigación en muestras de HF y orina aumentamos la probabilidad de revelar la infección bacteriana y además; cabe destacar que el 72% de las infecciones por *C.trachomatis* fueron detectadas en las muestras faríngeas; destacando que en el grupo SAS existe mas probabilidades (OR: 2,44 0,52-12,83) de detectar la bacteria en esta muestra que en la orina o quizás el contacto oral-genital es la vía de transmisión más frecuente en los casos de AS.

La PCR dirigida al gen codificante del plásmido críptico; fue más sensible ya que reveló la mayoría de las infecciones por *C.trachomatis* quizás porque la carga bacteriana era muy baja en las muestras¹⁶. Por esa razón no se determinó el genotipo en todas las muestras positivas; ya que la RFLP se realiza sobre el producto de la PCR dirigida al gen *ompA*. Se observa en la foto 1 la genotipificación de una muestra de HF de una nena; en la cual se determinó la presencia del genotipo D de *C.trachomatis*.

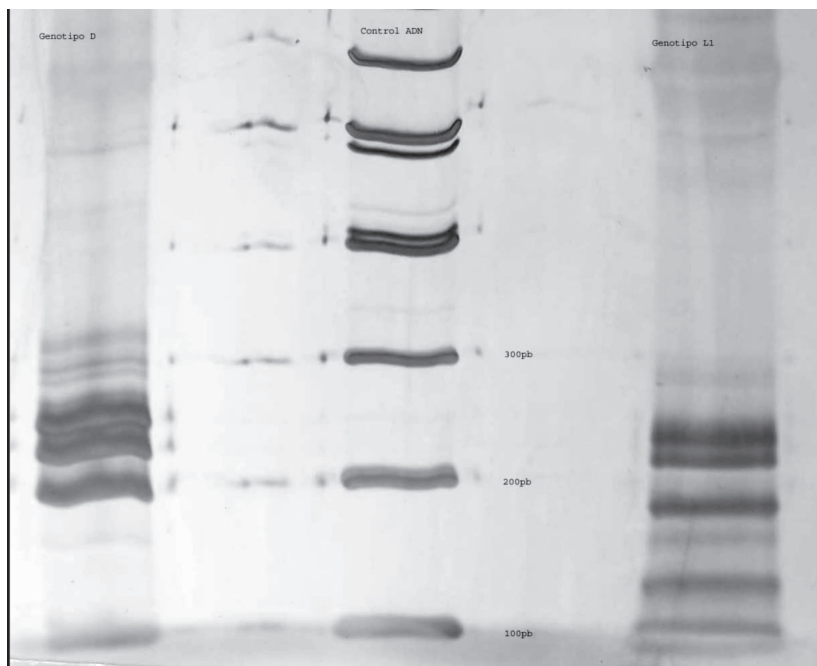


Foto N°1: Fotografía del gel de poliacrilamida revelado con coloración de plata⁹. Se observa la RFLP del genotipo D y del genotipo L1, la calle central corresponde al control de ADN.

Se detectó la presencia del ADN del VPH en 4 (7,8%) de 51 muestras estudiadas; correspondientes a 2 HF y 2 orinas de 4 niñas de 8 años (N=2) y 9 años (N=2) del grupo SAS. La detección de VPH fue más frecuente en el rango etario de 6 a 10 años. No fue estadísticamente significativo el hallazgo de VPH en las muestras de los niños, se reitera que su detección es sospecha del AS pero no confirmatoria del mismo. Los genotipos de VPH detectados fueron 6 y 11; se demostró una buena correlación de la secuenciación y la RFLP para las muestras de VPH y se correlaciona con hallazgos de otros autores¹⁵. En el árbol filogenético obtenido (Figura N°1), las secuencias analizadas se dividen en dos ramas. Una de ellas contiene las secuencias VPH 16 y la otra rama los genotipos 6 y 11. Las secuencias de VPH 6 (HPV6X4) se asocian dentro de un mismo grupo. En cambio, los genotipos 11 (HPV11X89)

agrupan en tres ramas. El análisis filogenético mostró amplias similitudes en las secuencias VPH 6 y algunas diferencias en las VPH 11; pudiendo inferir que las que agruparon en diferentes ramas en forma individual, podrían pertenecer a subtipos o variantes. Nuestro trabajo es el primero que se realiza en Córdoba utilizando el análisis filogenético sobre las secuencias de los genotipos del VPH detectados en los niños con SAS.

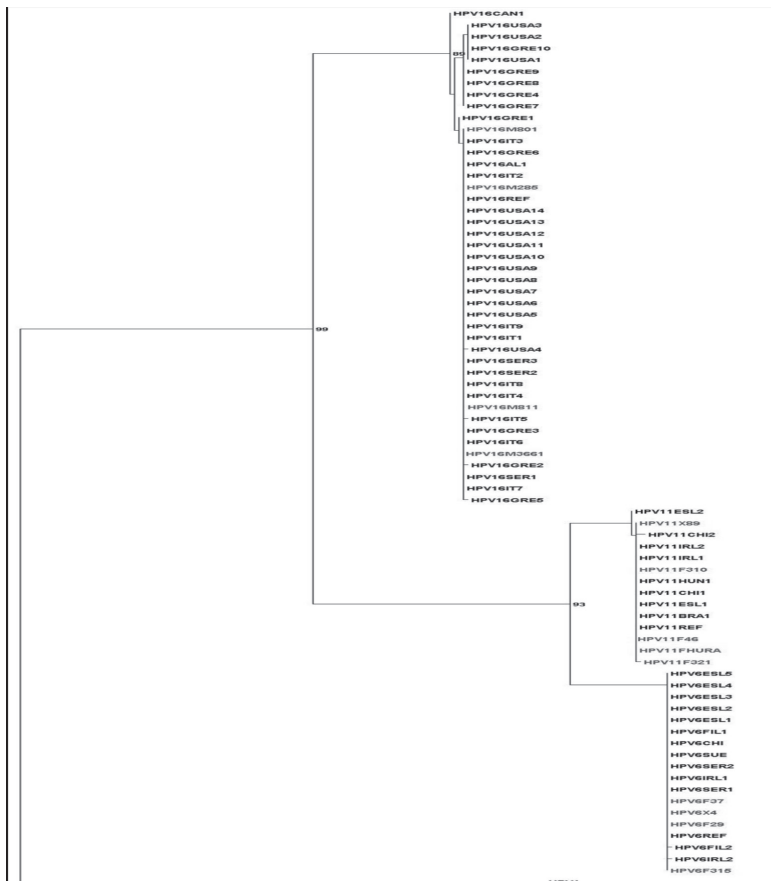


Figura 1: Análisis filogenético de la región L1 del genoma de VPH (450 bp) construido por Maximum likelihood usando TIM2+G como modelo, con parámetros sugeridos por JModelTest 3.7 (PhyML software). Los bootstrap ($\geq 50\%$) están indicados en los nodos internos (1000 pseudoreplicas).

Se investigó la presencia del ADN del *M.genitalium* en 39 muestras, resultaron 3 (7,7%) muestras de HF positivas; sin asociación estadística, correspondientes a 3 niñas de 2 años (N=1) y de 7 años (N=2) del grupo SAS.

Dentro del Grupo Control se detectó *C.trachomatis* sólo en una muestra (4%) de HF de una niña de 9 años. Aunque ingresó al grupo control porque asistió a un examen solicitado por la escuela y sin ninguna sospecha de abuso sexual. Sin embargo, no se puede descartar el contacto con secreciones genitales infectadas con *C.trachomatis*. Las muestras del grupo control resultaron negativas para la presencia de VPH y *M.genitalium*.

Todas las infecciones detectadas resultaron monoinfecciones. Los demás datos de ITS son secretos del expediente judicial por lo tanto no fueron incluidos en nuestros resultados.

CONCLUSIONES

Nuestro trabajo; el primero en Córdoba, proporcionó datos sobre la presencia de *C.trachomatis* en población pediátrica con sospecha de abuso sexual. Motivó a los profesionales pediátricos a estar atentos a esta ITS; enfatizando la realización del diagnóstico y de su tratamiento precoz.

Se demostró que las niñas con sospecha de AS tenían una mayor probabilidad de estar infectadas por *C.trachomatis* y que se destaca que la muestra faríngea debe ser considerada para confirmar el AS en la población infantil con riesgo. Se aportaron datos sobre las características moleculares de las secuencias genéticas de *C.trachomatis* y de VPH.

Se continuará promoviendo el diseño de un protocolo diagnóstico y terapéutico para implementar en forma sistemática, y que actualmente no es considerado en ningún paciente con AS que se atiende en los hospitales de Córdoba. Sin duda la implementación del diagnóstico de *C.trachomatis* reducirá notablemente las complicaciones y secuelas de aquellos niños infectados.

Es de gran importancia la interacción multidisciplinaria a fin de alcanzar un consenso en estrategias de diagnóstico y seguimiento de los niños con SAS. Como resultado de los trabajos colaborativos aprovechando al máximo las capacidades de los distintos profesionales, se podrá obtener información que elevada a las autoridades de Salud conducirá a un mejor diseño y ejecución de programas de control de los niños con SAS y prevención de las secuelas por la infección crónica de *C.trachomatis*, como así también de las otras patologías inducidas por las ITS.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a:

Fundación "Alberto J. Roemmers" por otorgar el subsidio mediante el cual pudo concretarse el presente proyecto.

Personal de la Unidad Judicial de la mujer y el niño de Córdoba, especialmente a la Dra. S. Gamboa.

Personal del Dispensario N°24 Cupani; especialmente a su directora: Dra. María Teresa Gener.

Personal del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad" de la ciudad de Córdoba. Director: Héctor de Uriarte y la Dra. M. Miras.

Los niños, padres y tutores que amablemente participaron en este estudio.

ABSTRACT

The early detection and treatment of sexually transmitted infections (STI) like *Chlamydia trachomatis* can prevent their serious complications.

Objective: To detect *C. trachomatis* in samples of children with suspected sexual abuse (SSA) attending the Judicial Unit of Córdoba city and to compare these results with a control group.

Overall prevalence of *C. trachomatis* was 13.3% (10/75); 54 children with SSA and 21 from the control group; the infection was more common in girls and within the ages of 6 to 10 years. Children with SSA were 4 times more likely to have *C. trachomatis* than control kids. Girls with SSA had higher risk (OR: 2.91 03.3-68.57) of infection than total children from the same group. *C. trachomatis* was detected in throat swabs more often (72%) than in urine samples. This bacterium infects the oral mucosa; perhaps oral-genital contact is the most frequent route of infection in the SSA population.

Four samples (7.8%) were HPV (+) while *M. genitalium* was detected in 3 (7.7%) samples of the SSA group. Data showed no significant association. Genotype D of *C. trachomatis* and HPV 6-11 were detected in this group.

In the Control Group, *C. trachomatis* was detected only in one throat swab sample (4%) from a 9-year-old girl; she was included in this group because she consulted for a routine school health check up without any suspicion of sexual abuse; however, we should not discard previous contact with genital secretions infected with *C. trachomatis*. Samples from the control group were (-) for HPV and *M. genitalium*.

Our study, the first in Cordoba, provides important data on the presence of *C. trachomatis* in the pediatric population with SSA. Health care professionals should be aware of this STI and emphasize its early diagnosis and treatment. Undoubtedly, these preventive measures would significantly reduce its complications and consequences in infected children.

BIBLIOGRAFÍA

1. American Academy of Pediatrics. Guidelines for the Evaluation of Sexual Abuse of Children: Subject Review. *Pediatrics* 103(1), 186-191. 1999.
2. Bernard HU et al. Identification and Assessment Of Known And Novel Human *Papillomaviruses* by Polymerase Chain Reaction Amplification, Restriction Fragment Length Polymorphisms, Nucleotide Sequence, and Phylogenetic Algorithms. *J Infect Dis* 170(5), 1077-1085. 1994.
3. Comité de Salud Mental de la Sociedad Argentina de Pediatría. Grupo de Trabajo sobre Violencia Familiar. ¿Qué hacer cuando se sospecha que un niño es abusado sexualmente? *Arch Argent Pediatr* 105(4), 357-367. 2007.
4. Cuffini C. Obtención, caracterización y aplicación en el diagnóstico de anticuerpos monoclonales anti Lipopolisacáridos y Proteína mayor de membrana externa de la *C. trachomatis*; Tesis de Magister en Ciencias Químicas. 1998.
5. Cuffini C, Bottiglieri M, Kiguen X, Alonso CA, Valdes Deimundo R, Isa MB, Cannistraci R, Gonzalez S, Farinati A. Molecular Epidemiology of Genital *Chlamydia trachomatis* Infection in Asymptomatic Adolescent-Young People. *J Microbiol Res* 2(4), 114-117. 2012.
6. Farinati A, Zitto T, Bottiglieri M, Gastaldello R, Cannistraci R, Gonzalez S, Tossoroni D, Isa MB, Pavan J, López H, Cuffini C. Infecciones asintomáticas por *Chlamydia trachomatis*: un problema controlable en la población adolescente. *Rev Panam Infectol* 10(1), 8-12. 2008.
7. Ferreira AL, Beltrán MB, Montoya C, Nuñez O, Bossio JC. Documento de Maltrato Infantil y Abuso sexual en la niñez. Asociación Integrada a las enfermedades prevalentes de la Infancia (aipei) OPS, OMS. 2010.
8. Hammerschlag MR. Sexually transmitted diseases in sexually abused children: medical and legal implications. *Sex Transm Inf* 74, 167-174. 1998.
9. Hering AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid Diagnosis of rotavirus infections by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 16, 473-7. 1982.
10. Heger A, Ticson L, Velasquez O, Bernier R. Children referred for possible sexual abuse: medical findings in 2384 children. *Child Abuse Negl* 26(6-7), 645-59. 2002.
11. Jensen JS, Uldum SA, Sondergard-Andersen J, Vuust J, Lind K. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin. Microbiol* 1, 46-50. 1991.
12. Kakar S, Bhalla P, Maria A, Rana M, Chawla R, Mathur NB. *Chlamydia tra-*

- chomatis* causing neonatal conjunctivitis in a tertiary care center. Indian J Med Microbiol 28, 45-7. 2010.
13. **Kellogg N, the Committee on Child Abuse and Neglect.** The Evaluation of Sexual Abuse in Children. Pediatrics 116², 506-512. 2005.
 14. Kumar, S. Tamura, K. Nei, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform 5, 150-163. 2004.
 15. Mataix Díaz J., Betloach Masa I., Pastor Tomás N., Bañuls Roca J. y Martínez MT. Verrugas anogenitales: estudio clínico-patológico y virológico. An Pediatr 69(6), 572-6. 2008.
 16. Miyashita N, Lijima Y, Matsumoto A. Evaluation of the sensitivity and specificity of polymerase chain reaction test kit, Amplicor *Chlamydia trachomatis*. Microbiol Immunol 38¹, 81-5. 1994.
 17. Muñoz OM, Romero FP y Martínez TA. Infecciones de transmisión sexual: Experiencia en una unidad de ginecología pediátrica. Rev chil pediatr 74, 468-474. 2003.
 18. Peláez Mendoza J. El abuso sexual y su asociación con las infecciones de transmisión sexual. Rev Cubana Obstet Ginecol 36, 109-123. 2010.
 19. Soper DE; Pelvic inflammatory disease. Obstet Gynecol 116, 419-428. 2010.
 20. US Department of Health and Human Services, Administration for Children and Families, Administration on Children, Youth and Families, Children's Bureau. Child Maltreatment 2009. 2010.
 21. Walboomers JMM, Roosen daal R, van Doornum GJJ, MacLaren DM, Meijer CJLM, van den Brule AJC. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 31, 1060-1065. 1993.

EPIDEMIOLOGÍA DE LA MALARIA EN EL NOROESTE DE ARGENTINA: DINÁMICA DE LA TRANSMISIÓN

María Julia Dantur Juri^{1,2}, Mario Zaidenberg³, Marcelo Abril⁴,
Cecilia Veggiani Aybar¹, Guillermina Galante¹, María Sofía Olea¹,
Enrique Laci³, Cristian Laci³, Daniel Carrizo³, Adán Alancay³,
Jorge Romero³, Vicenta González⁵, Aida de Lucio⁵,
Patricia Mula Lozano⁵, Pedro Berzosa Díaz⁵

¹Instituto Superior de Entomología "Dr. Abraham Willink", Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, Miguel Lillo 205, San Miguel de Tucumán, (4000) Tucumán, Argentina; ²IAMRA, Universidad Nacional de Chilecito, 9 de Julio 22, (5360) Chilecito, La Rioja, Argentina;

³Coordinación Nacional de Control de Vectores, Ministerio de Salud de la Nación, Güemes 125, Piso 1, (4400) Salta, Argentina; ⁴Fundación Mundo Sano, Paraguay 1575, (1061) Buenos Aires, Argentina; ⁵Laboratorio de Malaria, Centro de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III, Sinesio Delgado 6, (28029) Madrid, España

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria que afecta a millones de personas en el mundo. Se encuentra distribuida en casi alrededor de 100 países tropicales y subtropicales, abarcando América Central, América del Sur, islas del Caribe, África, India, Sureste y Este Medio de Asia y Oceanía, posicionándola como una enfermedad difícil de controlar y más aún de erradicar (World Health Organization, 2011).

En 2009 se reportó para América una reducción de más del 50% en el número de casos registrados entre 2000 y 2009 en 11 países, incluidos Argentina, Belice, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Paraguay, Bolivia y Surinam. Actualmente, Argentina, El Salvador, México y Paraguay, se encuentran en la fase de pre-eliminación; y dos países (Bahamas y Jamaica) en una etapa de prevención de la re-introducción de la malaria después de sus brotes locales subsecuentes a la importación de los parásitos (World Health Organization, 2011).

En la Argentina, en el año 1959 se implementó el Programa de Erradicación de la malaria por un convenio de la Oficina Sanitaria Panamericana y la Organización Mundial de la Salud. A partir de ese año el número de casos de malaria comenzó a disminuir, resurgiendo la enfermedad en 1967. Su

agente más eficaz hasta ese momento era *Plasmodium vivax*, presentándose también *P. falciparum* y casos mixtos (Carcavallo & Martínez, 1968). Desde 1990, los casos de malaria disminuyeron, volviendo a aumentar en 1996 con 2.048 casos reportados. Posteriormente los casos disminuyeron hasta el año 2010 con solamente 54 reportes (World Health Organization, 2011).

De acuerdo a World Health Organization (2012), Argentina se encuentra incluida en la fase de pre-eliminación de malaria, siendo uno de los objetivos específicos planteados, la detección activa de los casos autóctonos de enfermos. Por lo tanto, la realización de este proyecto de investigación significa un avance en el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en todos los niveles, desde el vector de la misma hasta el parásito, así como también sus interrelaciones. Los objetivos planteados fueron realizar una revisión de muestras de frotis de gota gruesa y extendido de sangre de humanos positivas para *Plasmodium vivax*, detectar la presencia del/de los parásito/s de la malaria en los mosquitos vectores y por último, detectar la presencia del/de los parásito/s de la malaria en muestras de sangre de humanos en el noroeste de la Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Revisión de muestras de frotis (gota gruesa y extendido) positivas para *Plasmodium vivax*

Se planteó antes de llevar a cabo la recolección de muestras de muestras de mosquitos y de sangre en humanos, realizar una revisión de las muestras de frotis de gota gruesa y extendido de personas que presentaron síntomas febriles desde 1983 hasta 2001, a fin no sólo de confirmar la presencia del parásito implicado, *Plasmodium vivax*, sino también de detectar la presencia de otros parásitos, que pudieran aparecer a modo de co-infección.

De octubre a diciembre de 2012, se llevó a cabo un análisis preliminar de 166 muestras de gota gruesa y extendido de personas con síntomas de malaria de diferentes localidades situadas en el noroeste de la Argentina (en la frontera con Bolivia) donde hubo gran cantidad de reportes de enfermos en el pasado y todavía hay reportes de casos importados de malaria. Estas localidades fueron Aguas Blancas (22° 43' S, 64° 22' O), El Oculto (23° 06' S, 64° 30' O), San Ramón de la Nueva Orán (23° 08' S; 64° 20' O), Pichanal (23°

19° S, 64° 13' O), Embarcación (23° 13' S, 64° 06' O) General Ballivian (22° 56' S, 63° 52' O), General Mosconi (22° 36' S, 63° 49' O), Tartagal (22° 32' S, 63° 49' O), Aguaray (22° 16' S, 63° 44' O), Campo Durán (22° 14' S, 63° 42' O) y Salvador Mazza (22° 04' S, 63° 43' O).

Sitios de muestreo de mosquitos y recolección de ejemplares

Se seleccionaron 3 sitios de muestreo de especímenes adultos a lo largo de la frontera de Argentina con Bolivia. Las áreas periféricas de las ciudades de Yacuiba (22° 0' 50" S, 63° 40' 40" O) y de Bermejo (22° 35' 24" S, 64° 14' 55" O) (departamento Tarija, Bolivia) fueron seleccionadas en los primeros muestreos.

Posteriormente, debido a problemas de seguridad, se continuó realizando los muestreos en la periferia de Bermejo y de Acambuco (22° 13' S, 63° 57' O) (ubicado entre las localidades de Tartagal y Salvador Mazza).

A su vez, en cada sitio, se seleccionaron los ambientes de selva y de borde de selva (borde de camino y borde de arroyo) para la colocación de las trampas y la captura de los mosquitos adultos.

Recolección de formas adultas

Durante 2010, en Yacuiba y Bermejo los muestreos se llevaron a cabo en octubre (del 26 al 28) y en noviembre (del 17 al 19) (primavera) durante dos noches consecutivas.

Durante 2011, en Bermejo la recolección se realizó en enero (del 10 al 12) (verano), en abril (del 20 al 22) (otoño), en septiembre (del 27 al 29) (primavera) y en noviembre (del 10 al 12) (primavera) durante dos noches consecutivas. En Acambuco (Tartagal) se realizaron muestreos en noviembre (del 3 al 5) (primavera), permaneciendo las trampas activas durante dos noches consecutivas.

Durante 2012, se realizaron muestreos en Acambuco en marzo (del 8 al 10 de marzo) (verano) y en abril (del 18 al 20) durante dos noches consecutivas.

Captura de mosquitos para estudios parasitológicos

La captura de mosquitos adultos se realizó mediante trampas de luz tipo CDC las cuales fueron complementadas con hielo seco. Las trampas CDC además de tener luz blanca, también tenían luz UV. Se colocaron 6 trampas de luz tipo CDC, 4 con luz blanca y dos con UV, las cuales permanecieron activas durante dos noches consecutivas (18:00-10:00 hrs.) con el objetivo de recolectar mosquitos de hábitos crepusculares, nocturnos y diurnos.

Los mosquitos fueron trasladados al laboratorio, sacrificados y conservados en tubos eppendorf con silicagel. Cada tubo eppendorf tenía un código que nos permitió identificar en la base de datos, el día, la hora el lugar de captura así como datos epidemiológicos de interés. En el laboratorio fueron en primer lugar identificados mediante claves morfológicas y posteriormente se procedió a su procesamiento para la detección parasitológica.

Detección parasitológica en mosquitos

Una vez identificados los mosquitos, fueron enviados al Laboratorio de Malaria, del Centro de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III, en Madrid donde se realizaron los estudios moleculares.

Extracción de ADN y amplificación genómica para la identificación de la presencia del parásito

Previo a la extracción de ADN, se realizó una disección del mosquito, de manera que por cada mosquito fueron necesarias dos extracciones de ADN, una de la cabeza-tórax y otra del abdomen. La extracción de ADN fue realizada de acuerdo al protocolo fenol-cloroformo de Donnelly et al. (1999). La detección e identificación de las especies de *Plasmodium* presentes en los mosquitos fue llevada a cabo mediante una PCR múltiple semianidada de acuerdo a Rubio et al. (2002) y Lardeux et al. (2008) con algunas modificaciones.

En la electroforesis en los geles de agarosa se empleó un método para la separación de los fragmentos de ADN después de la amplificación. Los geles se prepararon con agarosa (Pronadisa®) al 2% y se tiñeron con 0,5µg/ml de bromuro de etidio. Las bandas que aparecieron en el gel se visualizaron a través de un transiluminador con luz ultravioleta (Gel Doc 2000, Bio Rad®) y las imágenes se procesaron utilizando el programa Quantity One v.4.4.0. (Bio Rad®). El peso molecular de los fragmentos se determinó utilizando marcadores de PCR (Biotools®) con rango de 1000 a 80 pb.

Para llevar a cabo la PCR se incluyeron una serie de primers que se detallan en la Tabla 1 que sirven para la identificación de las especies de *Plasmodium*.

Tabla 1. Nombres de los primers, las secuencias objetivos, y el tamaño del producto de PCR (en pb) de acuerdo a Rubio et al. (2002) y Lardeux et al. (2008), y utilizadas en el presente estudio.

Primer	Secuencia (5'- 3')	Especificidad	Tamaño del producto de PCR (pb)
UNR	GACGGTATCTGATCGTCTTC	Universal	
PLF	AGTGTGTATCAATCGAGTTTC	<i>Plasmodium</i>	<i>P. malariae</i> = 821 <i>P. falciparum</i> = 787 <i>P. vivax</i> = 783
FAR	AGTTCCCCTAGAATAGTTACA	<i>P. falciparum</i>	395
MAR	GCCCTCCAATTGCCTTCTG	<i>P. falciparum</i>	269
VIR	AGGACTTCCAAGCCGAAGC	<i>P. vivax</i>	499

Se utilizaron diversos controles: un control negativo del mosquito (un mosquito de cría no infectado), un control positivo del mosquito (un mosquito del laboratorio infectado con *P. vivax*) y sangre infectada con *P. vivax* y *P. falciparum*.

Detección de *Plasmodium* spp. en muestras de sangre de humanos

Recolección de muestras de sangre de humanos

Las muestras de sangre de humanos fueron obtenidas durante diciembre de 2012 a partir de personas seleccionadas al azar que viven en la localidad fronteriza de Salvador Mazza (departamento San Martín). Debido a la falta de casos autóctonos en nuestro país, se consideró la posibilidad de que las personas seleccionadas puedan ser asintomáticas para malaria. A su vez, también fueron considerados dos casos, en los cuáles las personas reportaban síntomas febriles intermitentes. La sangre se obtuvo por punción de un dedo de la mano para preparar una gota gruesa y un extendido. Gotas adicionales se utilizaron para impregnar un círculo de 1 cm de papel filtro (Whatman N° 2) (Whatman®, USA).

Las gotas gruesas y los extendidos de sangre se secaron al aire, el extendido se fijó con metanol y ambas muestras fueron teñidas con Giemsa y posteriormente observadas en el microscopio estereoscópico y preservadas.

Antes de la toma de muestra, a cada paciente se le informó sobre el estudio y se obtuvo el consentimiento (en el caso de los niños, los padres/

tutores dieron su consentimiento informado). La metodología seguida, incluyendo los aspectos éticos, fue aprobada por el Ministerio de Salud de la Nación, el cual tiene un Comité de Ética que revisó estos aspectos. Ellos están incluidos en el Protocolo del Manual de Normas y Procedimientos de Vigilancia y Control de Enfermedades de Notificación Obligatoria, Ministerio de Salud Argentina.

Extracción de ADN y amplificación genómica para la identificación de la presencia del parásito en muestra de sangre de humanos

A partir de las muestras recogidas en las tarjetas de papel filtro (Whatman®, USA), para poder realizar la extracción del ADN, se realizó un procedimiento que incluyó el lavado de la sangre seca depositada de cada tarjeta con un reactivo de purificación Whatman® FTA®, y con la solución tampón TE. A continuación se pudo llevar a cabo los análisis de PCR.

La detección e identificación de las especies de *Plasmodium* spp. presentes en las muestras de sangre fue llevada a cabo mediante una PCR anidada de acuerdo a Snounou et al. (1993), con algunas modificaciones.

RESULTADOS

Revisión de muestras de sangre (gota gruesa y extendido) positivas para *Plasmodium* spp. Presencia de co-infección *Plasmodium vivax* - *Mansonella ozzardi*

De 166 muestras positivas para *Plasmodium vivax*, se observó un caso de co-infección con otro parásito llamado *Mansonella ozzardi*. La persona es un hombre de 70 años de edad que vive en la localidad de Tartagal. El paciente llegó a la Base Regional con fiebre y escalofríos. Se le tomó la muestra de gota gruesa y extendido, y luego se realizó la revisión microscópica. Estas pruebas revelaron la presencia de los parásitos *Plasmodium vivax* e indirectamente de *Mansonella ozzardi*. El diagnóstico fue confirmado por un técnico especialista de laboratorio de la Base de Referencia de malaria del Ministerio de Salud de Argentina, en la ciudad de Salta capital.

Se observó la presencia de trofozoítos de *P. vivax* en la muestra de sangre, mostrando citoplasma ameboidal y puntos grandes cromatina. Las formas larvales o microfilarias de *Mansonella ozzardi* presentan una región anterior con un espacio cefálico que termina cuando comienza una columna de núcleos, observándose un primer núcleo bien notorio seguido de dos

núcleos que parecen estar unidos. La longitud total de la microfilaria fue de 148,2 μm , y su diámetro de 3,1 μm ; estos valores se encuentran incluidos en los promedios establecidos para esta especie (Figura 1).

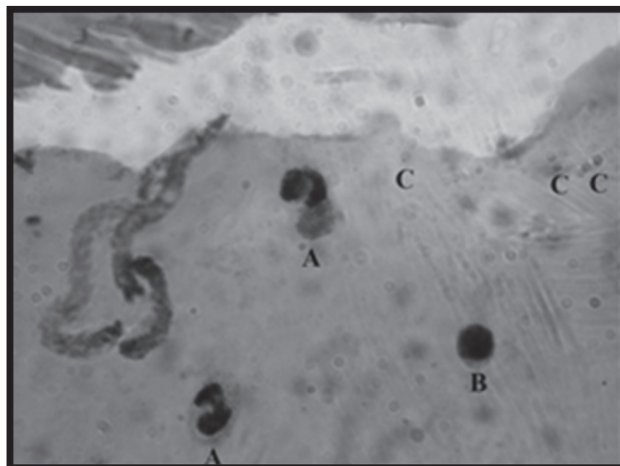


Figura 1. Resultado del análisis microscópico de la muestra de frotis teñida con Giemsa de un paciente infectado con *Plasmodium vivax* y *Mansonella ozzardi* (A = neutrófilos, B = linfocitos y C = trofozoítos).

Al mismo tiempo se completó la ficha epidemiológica incluyendo información relativa a la fecha de la consulta (día, mes, año), nombre y dirección del paciente, el lugar donde la enfermedad fue supuestamente adquirida, viajes durante los tres meses anteriores, el tipo de trabajo y la nacionalidad. La investigación epidemiológica reveló que el hombre que vive en la ciudad de Tartagal y trabaja en una finca bananera cerca de la ciudad, adquirió la malaria en Yacuiba (ciudad en la frontera de Bolivia) donde viajó dos semanas antes del informe. El paciente no sufrió ningún tipo de dolor, solamente episodios de fiebre cada día por medio. Después de la confirmación de laboratorio, el paciente recibió tratamiento con una combinación de pastillas de cloroquina/primaquina durante dos semanas consecutivas. Las dosis utilizadas fueron consistentes con las pautas de la World Health Organization, que consiste en un comprimido al día de fosfato de cloroquina BP 242 mg (Micro Labs Limited, Hosur, India) durante dos semanas y un comprimido por

día de Aralen fosfato/primaquina fosfato 15 mg (Sanofi Aventis EE.UU. LLC, Bridgewater, NJ, Estados Unidos) durante tres días consecutivos en el inicio del tratamiento.

Al momento del reporte, no se consideró un tratamiento para las microfilarias, ya que no existe uno como tal que se aplique a nivel del Ministerio de Salud. Cabe destacar que no se reportaron complicaciones durante o después del tratamiento para la malaria.

Detección de *Plasmodium* en mosquitos *Anopheles* capturados en la selva

Se recolectaron en total 970 ejemplares de mosquitos anofelinos, siendo los meses de octubre y noviembre de 2010 y de septiembre y noviembre de 2011 (correspondientes a la primavera), los que mostraron la mayor abundancia de individuos (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidad de mosquitos anofelinos capturados por año de estudio.

Año	Meses	Nº de meses	Cantidad de individuos
2010	Oct-Nov (primavera)	1	256
2011	Enero (verano)	1	97
2011	Abril (otoño)	2	132
2011	Sep-Nov (primavera)	1	238
2012	Marzo (verano)	1	130
2012	Abril (otoño)	2	117
		Total de meses: 8	Total de individuos: 970

Del total de anofelinos capturado, *An. pseudopunctipennis* resultó la especie más abundante (35,15%), seguida de *An. argyritarsis* (26,08%), *An. strodei* (12,9%) y *An. evansae* (11,13%) (Tabla 3).

Tabla 3. Total (N) y porcentaje (%) de especies de anofelinos recolectados.

Especies de anofelinos Muestreos Total						
	Trampas CDC				Trampas UV	
	N	%	N	%	N	%
<i>An. pseudopunctipennis</i>	152	31,02	189	39,37	341	35,15
<i>An. strodei</i>	70	14,3	55	11,46	125	12,9
<i>An. rangeli</i>	1	0,20	0	0	1	0,10
<i>An. argyritarsis</i>	120	24,49	133	27,71	253	26,08
<i>An. rondoni</i>	20	4,08	0	0	20	2,06
<i>An. evansae</i>	60	12,24	48	10	108	11,13
<i>An. (Ano.) spp.</i>	37	7,55	37	7,71	74	7,63
<i>An. (Nys.) spp.</i>	30	6,12	18	3,75	48	4,95
Total	490	100	480	100	970	100

Para *An. pseudopunctipennis*, de los 34 pooles analizados, todos fueron negativos para *Plasmodium vivax* sobre los geles de agarosa, y posteriormente confirmados en los geles de poliacrilamida. Para *An. argyritarsis*, de los 25 pooles analizados, se observó también que ninguno de los mismos fueron positivos para *Plasmodium vivax*.

No se observó infección debido a *Plasmodium vivax* en las especies de mosquitos anofelinos ni considerando las localidades de muestreo ni los períodos en que se recolectaron los ejemplares. Tampoco se detectaron mosquitos anofelinos infectados ni con *P. falciparum* ni *Plasmodium malariae* (Tabla 4).

Tabla 4. Pooles de mosquitos analizados por PCR semianidada para *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae* recolectados en el extremo noroeste de Argentina.

Especies N° de N° de PCR semianidada pooles mosquitos <i>P. vivax</i> <i>P. falciparum</i> <i>P. malariae</i>			
<i>An. pseudopunctipennis</i>	34	341	0 0 0
<i>An. strodei</i>	12	125	0 0 0
<i>An. rangeli</i>	1	1	0 0 0
<i>An. argyritarsis</i>	25	253	0 0 0
<i>An. rondoni</i>	20	20	0 0 0
<i>An. evansae</i>	11	108	0 0 0
<i>An. spp.</i>	7	74	0 0 0
<i>An. spp.</i>	5	48	0 0 0
Total	115	970	0 0 0

Detección de *Plasmodium* en muestras de sangre de humanos

La presencia de parásitos del género *Plasmodium* fue analizada mediante PCR anidada observándose la ausencia de casos positivos.

254 muestras de sangre, obtenidas mediante la punción de un dedo de la mano, fueron analizadas para la detección de *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*, no observándose ningún resultado positivo. Estas muestras correspondieron a personas que viven en diferentes barrios/asentamientos de la localidad de Salvador Mazza, tales como 5 de Septiembre, Alto Verde, 40 Viviendas, El Chorro, Sector 5, entre otros.

Al considerar el sexo, de las 254 muestras, 147 pertenecieron al sexo femenino, y los restantes 107 al sexo masculino. En cuanto al grupo etáreo, la mayor cantidad de muestras correspondieron al grupo etéreo comprendido entre 0-20 años para ambos sexos, seguido del grupo de 21-35 años para el sexo masculino y el grupo de 36-50 años para el sexo femenino.

DISCUSIÓN

De acuerdo a lo requerido por la World Health Organization (2012), al estar Argentina incluida en la fase de pre-eliminación de la malaria, la detección de casos autóctonos de la enfermedad resulta de vital importancia. Por tal motivo, es que se llevaron a cabo estos estudios tendientes a la tanto a la detección de parásitos del género *Plasmodium* en muestras conservadas de pacientes que tuvieron síntomas febriles (para confirmar la identificación del parásito y la posible presencia de co-infección con otro parásito) como en muestras de mosquitos capturados durante el período en el que está registrada la presencia de la enfermedad. Y por último, ante la falta de casos autóctonos reportados, se realizaron estudios tendientes a la detección de la posible presencia del parásito *Plasmodium vivax* en personas que no presentaban síntomas de la enfermedad (asintomáticos).

Los resultados obtenidos del presente estudio resultan muy importantes para ser tenidos en cuenta en relación a la transmisión de la enfermedad en Argentina, para que así el país pueda ser incluido en la siguiente fase, que es la fase de eliminación de la malaria.

Después del programa de erradicación de la malaria en 1959, los casos de la enfermedad disminuyeron considerablemente hasta que resurgió nuevamente en 1967 (Carcavallo & Martínez, 1968). Desde entonces, no sólo la búsqueda activa de personas enfermas por malaria llevada a cabo por

los técnicos del Ministerio de Salud de la Nación, sino también el adecuado tratamiento de los pacientes mediante primaquina/cloroquina y el rociado de las viviendas y alrededores con deltametrina al 2,5% para los mosquitos anofelinos, han provocado la reducción de la incidencia de los casos de malaria.

Las últimas investigaciones indican que unos pocos casos autóctonos de malaria fueron positivos para *P. vivax*. Esta especie parece ser el único parásito incriminado en los casos de malaria en humanos, y el más tolerante a los cambios climáticos y ambientales, permitiéndole su supervivencia durante este tiempo en el noroeste de la Argentina (World Health Organization, 2011, 2012). El hallazgo del caso de co-infección de *P. vivax* con *M. ozzardi* también resulta un hecho importante. Si bien en el pasado hubo numerosos reportes de co-infección, esta disminuyó durante estas décadas, reportando en los últimos estudios la elevada prevalencia de las microfilarias (Remondegui et al. 1988).

La ausencia de parásitos del género *Plasmodium*, y en particular *P. vivax* en las muestras de mosquitos anofelinos es muy importante para ser tenida en cuenta. Si bien el vector *An. pseudopunctipennis* sigue siendo la especie más abundante, seguida por *An. argyritarsis*, el hecho de que no se encontraran infectados es un factor clave en el proceso para que el país pase a la fase propuesta por la World Health Organization.

En nuestro país, tanto las investigaciones de principios del siglo'20 como los últimos trabajos llevados a cabo en el noroeste reafirman que *An. pseudopunctipennis* sigue siendo una de las especies más abundantemente encontrada (Mühlens et al., 1925; Bejarano, 1953a, 1953b, Carcavallo & Martínez, 1968; Dantur Juri et al., 2003, 2005, 2009, 2010). En algunos países de América del Sur, inclusive Argentina, solo existen evidencias indirectas de la transmisión de la malaria, tales como la presencia de *An. pseudopunctipennis* en elevadas densidades (Mühlens et al., 1925) o su mayor abundancia precediendo a un pico de transmisión de la enfermedad (Dantur Juri et al., 2009).

Anopheles pseudopunctipennis es el principal vector de la malaria en la región de los Andes. Sin embargo, hasta ahora en Argentina, no hay una prueba directa que los esporozoítos de *Plasmodium* estén en esta especie. La técnica de ELISA ha sido usada para confirmar la presencia de infección natural de *An. pseudopunctipennis* con *P. vivax* en México (Fernández-Salas et al., 1994) y Perú (Hayes et al., 1987). Los parásitos de la malaria han sido también observados por disección de esta especie en muchos países de América Latina, pero nunca en Argentina. Así, el descubrimiento de *An. pseudopunctipennis* infectados para el país sigue siendo una incógnita.

En Argentina, *An. pseudopunctipennis* fue reportado anteriormente en asociación con *An. argyritarsis* (Mühlens et al., 1925; Bejarano, 1953a, 1953b), y en relación también con otras especies de anofelinos tales como *An. strodei*, *An. evansae*, *An. rangeli*, *An. rondoni* (Dantur Juri et al., 2003, 2005, 2009, 2010).

Si bien *An. pseudopunctipennis* es el único vector de malaria en el noroeste de la Argentina, su estatus podría ser cuestionado, aun cuando otra de las especies sea menos abundante. En este trabajo *An. argyritarsis* resultó segunda en abundancia, lo cual sumado a que es considerado como vector de malaria, resulta importante de ser tenido en cuenta para futuras investigaciones.

La ausencia de casos positivos de humanos para *Plasmodium* spp. y *Plasmodium vivax* en particular, también es muy importante de ser tenido en cuenta. Si bien, la búsqueda estuvo enfocada al hallazgo del/de los parásito/s en personas sin síntomas visibles de la enfermedad (asintomáticos), la ausencia de parásitos, es un paso más en la fase de pre-eliminación de la transmisión de la malaria en el país.

En conclusión, el estudio llevado a cabo permitió confirmar a *Plasmodium vivax*, como el parásito causante de la malaria, en el noroeste argentino de acuerdo a la revisión de muestras de pacientes. Se observó la presencia del parásito en co-infección con *Mansonella ozzardi*, parásito causante de la filariasis. Además se pudo confirmar la mayor abundancia de *An. pseudopunctipennis* seguida por *An. argyritarsis*, para la primavera, período en que comienzan a aparecer los casos de malaria. Si bien no se detectaron parásitos en ninguna de las especies de anofelinos, se espera llevar a cabo muestreos a fin de abarcar otras estaciones climáticas y obtener una mayor cantidad de ejemplares. Por último, la ausencia de *Plasmodium* spp. en las muestras de sangre de humanos, era de esperarse, ya que no hay registros actuales de casos autóctonos, pero de todos modos, es de suma importancia, ya que nos muestra que no hay casos asintomáticos de la enfermedad tampoco en circulación.,

BIBLIOGRAFÍA

1. Bejarano JFR. 1953a. Áreas palúdicas de la República Argentina. *Prim. J. Entomoepidemiol. Argentinas*. 1: 275-304.
2. Bejarano JFR. 1953b. *Anopheles* de la República Argentina y sus relaciones con el paludismo. *Prim. J. Entomoepidemiol. Argentinas*. 1: 304-329.

3. Carcavallo RU & Martínez A. 1968. Paludismo y sus transmisores. Investigaciones Científicas de las Fuerzas Armadas Argentinas. *Com. Cient. Entomoepid. República Argentina*. 13: 145-186.
4. Dantur Juri MJ, Zaidenberg M & Almirón WR. 2003. Fluctuación estacional de *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) en un área palúdica de Salta, Argentina. *Entomol. Vect.* 10: 457-468.
5. Dantur Juri MJ, Zaidenberg M & Almirón WR. 2005. Distribución espacial de *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) en un área palúdica de las Yungas de Salta, Argentina. *Rev. Saúde Pública*. 39: 565-570.
6. Dantur Juri MJ, Zaidenberg M, Claps GL, Santana M & Almirón WR. 2009. Malaria transmission in two localities in north-western Argentina. *Malar J.* 8: 18.
7. Dantur Juri MJ, Claps GL, Santana M, Zaidenberg M. & Almirón WR. 2010. Abundance patterns of *Anopheles pseudopunctipennis* and *Anopheles argyritarsis* in northwestern Argentina. *Acta Trop.* 115: 234-41.
8. Donnelly MJ, Cuamba N, Charlwood JD, Collins FH & Townson H. 1999. Population structure in the malaria vector, *Anopheles arabiensis* Patton, in East Africa. *Hered.* 83: 408-417.
9. Fernández-Salas I, Rodríguez MH, Roberts DR., Rodríguez C & Wirth RA. 1994. Bionomics of adult *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) in the Tapachula Foothills area of southern Mexico. *J. Med. Entomol.* 31: 663-670.
10. Hayes J, Calderón G, Falcón R & Zambrano V. 1987. Newly incriminated vectors of human malaria parasites in Junin Department. Peru. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3, 418-422.
11. Lardeux F, Tejerina R, Aliaga C, Ursic-Bedoya R, Lowenberger C & Chavez T. 2008. Optimization of a semi-nested multiplex PCR to identify *Plasmodium* parasites in wild-caught *Anopheles* in Bolivia, and its application to field epidemiological studies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102: 485-492.
12. Mühlens P, Dios RL, Petrocchi J, & Zuccarini JA. 1925. Paludismo en el Norte Argentino. *Rev. Inst. Bacteriológico del Dep. Nac. de Higiene*. 4: 207-289.
13. Remondegui C, Zafroff G, Ripio C, Arce M, Neder De Roman L & Esquivel O. 1988. *Mansonella ozzardi*: Estudio Clínico Epidemiológico de un foco endémico en la Provincia de Jujuy. *Acta Infectol.* 14: 313.
14. Rubio JM, Post RJ, Docters van Leeuwen WM, Henry MC, Lindergard G & Hommel M. 2002. Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 : 199-204.
15. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaitong S & Brown KN. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1: 315-320.
16. World Health Organization. 2011. World Malaria Report 2011. WHO Global Malaria Programme. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva, Switzerland.
17. World Health Organization. 2012. World Malaria Report 2012. WHO Global Malaria Programme. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva, Switzerland.

PREVENCIÓN PRIMARIA DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES EN JÓVENES

Eduardo M Escudero, María Celeste Villa-Abrille, Mariela Nolly, Oscar
Andrés Pinilla, Irene Ennis
Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Facultad de Ciencias Médicas.
Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN

El presente estudio fue diseñado para analizar la prevalencia de factores de riesgo cardiovasculares en una población joven centrando las observaciones en el análisis de la presión arterial y la posible repercusión en el corazón y las arterias. Se incorporaron 224 alumnos (138 mujeres) que cursaban el 2° año de Medicina en la UNLP con edad promedio de 22.13 ± 0.21 años. Los factores de riesgo más prevalentes resultaron los valores de presión arterial elevados por encima de la definida como normotensos (49%) y la obesidad (5,35%). Se identificaron 3 categorías según los valores de presión arterial de acuerdo a la clasificación del Joint Nacional Comité VII: normotensos NA ($< 120 / < 80$ mmHg), prehipertensos PH ($120-139 / 80-89$ mmHg) e hipertensos ($>140 / >90$ mmHg). Con una prevalencia de 55, 39 y 5% respectivamente, se puede ver que casi el 50% de la población tenía valores anormales de presión arterial. Al analizar la relación del estado estructural y funcional del ventrículo izquierdo y la aorta como expresión de compromiso subclínico se pudo ver que tanto en los HTA y en los PH el índice de masa ventricular izquierda era mayor que en los normotensos (NT: $29,04 \pm 0,54$ g/m^{2.7}; PH: $31,14 \pm 0,74$ g/m^{2.7}; HTA: $33,93 \pm 1,56$ g/m^{2.7} – NT vs PH $p < 0.03$ – NT vs HTA $p < 0.01$; PH vs HTA ns) y la distensibilidad aórtica resultó menor en esos grupos (NT: 1.19 ± 0.03 mmHg/ml/m²; PH: 1.38 ± 0.03 mmHg/ml/m²; HTA: 1.47 ± 0.11 mmHg/ml/m² NT vs HTA $p < 0,04$ – NT vs PH $p < 0,01$ –; PH vs HTA ns). Por otra parte al estudiar en un número representativo de jóvenes de cada grupo la velocidad de recuperación del pH intraplaquetario se observó mayor velocidad en los HTA, sugiriendo un aumento de la actividad del intercambiador sodio-hidrógeno en ese grupo.

Los resultados de estas observaciones muestran una elevada prevalencia de jóvenes con valores de presión arterial por encima de los normales.

Es importante destacar que más allá de identificar compromiso subclínico cardiovascular en la población de hipertensos a temprana edad este estudio nos da la posibilidad de comprender que aún sin tener cifras de presión para ser clasificados como hipertensos como se observa en los pre-hipertensos se evidencian diferencias en la estructura y función del corazón y los vasos en relación a los normotensos. Estos hallazgos ponen en evidencia la importancia de identificar en poblaciones de estas características a individuos sin manifestaciones clínicas pero con mayor riesgo de padecer eventos cardiovasculares a futuro, lo que permitiría acentuar la aplicación precoz de diferentes intervenciones para prevenir esa evolución.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the prevalence of cardiovascular risk in a youth population, focusing on the blood pressure and its repercussion on structure and function from heart and vessels. 224 students (138 women) from 2nd years of School of Medicine (UNLP) of 22.13 ± 0.21 years old were included in the study. The cardiovascular risks factors of larger prevalence were blood pressure values over the normal (49%) and obesity (5.35%). According to the VII Joint National Committee three categories was defined to blood pressure values: normotensive NT ($< 120/80$ mmHg), pre-hypertensive PH ($120-139 / 80-89$ mmHg) and hypertensive H ($>140/90$ mmHg). Prevalence was 55, 39 and 5% respectively, showing that approximately 50% of the population had blood pressure values over the normal. Analyzing the structure and function of the left ventricle (LV) and the aorta as a sign of subclinical damage of target organ, one can observe that HTA and PH group presented larger left ventricular mass index (NT: 29.04 ± 0.54 g/m^{2.7}; PH: 31.14 ± 0.74 g/m^{2.7}; HTA: 33.93 ± 1.56 g/m^{2.7} NT vs HTA $p < 0,01$ – NT vs PH $p < 0,03$ –; PH vs HTA ns) and minor aortic distensibility (NT: 1.19 ± 0.03 mmHg/ml/m²; PH: 1.38 ± 0.03 mmHg/ml/m²; HTA: 1.47 ± 0.11 mmHg/ml/m² NT vs HTA $p < 0,04$ – NT vs PH $p < 0,01$ –; PH vs HTA ns). On the other hand when the intra-platelet pH velocity recovering was studied in representative number of every group, HTA showed higher velocity in relation with NT and PH suggesting increase activity of sodium-hydrogen exchanger in this group.

The results presented show high prevalence of young people with values of blood pressure upper to the considered normal. On the other hand it is important to point that this population presents structural and functional

modification in aorta and left ventricle indicating the presence of subclinical alterations of target organs in PH and HTA groups. These findings highlight the importance of early identification to this young people in order to implement conducts to decrease the future risk of cardiovascular events.

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MÓDULO RCCX Y DE GENES DE FUSIÓN CYP21A2-CYP21A1P EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA DE NUESTRA POBLACIÓN.

Bioq. Cecilia S. Fernández

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia suprarrenal congénita es un síndrome que se caracteriza por déficit de cortisol y en algunos casos de aldosterona, ambos sintetizados por la corteza adrenal. El 90% de los casos se deben a alteraciones en la enzima 21-hidroxilasa. Se distinguen dos formas clínicas: la clásica (1/15.000), con dos variantes: Virilizante Simple (VS) y Perdedora de sal (PS), y la no clásica (NC) o de aparición tardía (1/100 a 1/1.000). El gen que codifica para la enzima 21-hidroxilasa es el CYP21A2 (6p21.3), el cual se halla formando parte del módulo RCCX. El módulo comprende parte del gen RP1, los genes del factor 4 del complemento (C4A y C4B), los genes CYP21 y una región del gen TNXB. Aproximadamente un 70% de los cromosomas estudiados contienen 2 módulos, con un gen activo (CYP21A2) en uno de ellos y un pseudogen inactivo (CYP21A1P) con 98% de identidad de secuencia en el otro. Al mismo tiempo, no es infrecuente encontrar cromosomas mono, tri y tetramodulares. La homología existente entre los módulos RCCX repetidos en tándem, incrementa la recombinación desigual, como consecuencia del apareamiento incorrecto de las cromátides. Como consecuencia, se producirán deleciones y duplicaciones que podrán involucrar al módulo del gen o al pseudogen. Además, dependiendo del punto de corte, podrán generarse genes CYP21 con la región 5' del pseudogen y la 3' del gen, denominados quimeras. Hasta la fecha se han reportado 6 genes quiméricos diferentes originados por grandes deleciones. Otro mecanismo involucrado en la generación de alelos deletéreos es el de conversión génica, mediante el cual se realiza una copia no recíproca de una porción de secuencia de una cromátide a otra. Puede abarcar cientos o solo algunas bases. En el primer caso, se originará un gen CYP21 quimérico similar al mencionado anteriormente. En el segundo, se produce la transferencia de mutaciones puntuales del pseu-

dogén al gen, siendo éste el principal mecanismo responsable de generar alelos defectuosos. El estudio del módulo se realiza mediante la técnica de Southern-blot y la restricción con las enzimas TaqI y BglII, las cuales han probado ser indicadores confiables para la caracterización de la región. El análisis del patrón de restricción obtenido utilizando sondas para CYP21, C4 y TNX, conjuntamente con la información de la búsqueda de las 10 mutaciones más frecuentes, permite dilucidar en la mayor parte de los casos, la estructura y composición modular. Sin embargo algunos genes quiméricos no pueden ser completamente diferenciados. En estos casos la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) permitiría la caracterización de estos últimos, a través de la amplificación diferencial de fragmentos de gran tamaño que abarquen la secuencia de fusión entre el pseudogen y el gen. En trabajos previos hemos analizado más de 450 pacientes mediante la búsqueda de las 10 mutaciones mas frecuentes del gen, e identificado mutaciones en el 93%, 89% y 70% de los cromosomas de los pacientes PS, VS y NC analizados, respectivamente. El objetivo de este trabajo es la caracterización del Módulo RCCX en una muestra de pacientes, caracterizando detalladamente los genes de fusión encontrados mediante la amplificación por PCR de fragmentos de gran tamaño.

OBJETIVOS

1. Caracterización molecular del módulo RCCX en pacientes afectados por hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21 hidroxilasa.
2. Caracterización de genes de fusión o quiméricos formados por los genes CYP21A1P y CYP21A2 generados por los mecanismos de recombinación desigual o conversión génica.

MATERIALES Y METODOS

Mediante el análisis de los resultados de la búsqueda de las mutaciones puntuales en el gen CYP21A2, se seleccionará un grupo de pacientes candidatos de ser portadores de genes quiméricos. Se realizará la caracterización de la región del módulo RCCX mediante la técnica de Southern blot en los pacientes seleccionados. Para esto, se digirá el ADN genómico con las

enzimas Taq I y Bgl II, luego se realizará la transferencia a membranas de nylon con posterior hibridación con sondas para los genes TNX, C4 y CYP 21, según la metodología puesta a punto en nuestro laboratorio. Del análisis de los resultados, se identificarán los haplotipos con genes quiméricos (CYP21A1P-CYP21A2). Para la caracterización molecular de éstas quimeras, se utilizará el ADN genómico de estos pacientes como templado para la realización de una PCR de aproximadamente 8,5 Kb, se usarán cebadores específicos que permitan la amplificación de un fragmento que abarque toda la secuencia del gen quimérico, y la utilización de una enzima polimerasa de alta fidelidad y procesividad. En los fragmentos obtenidos se realizará la búsqueda de las 10 mutaciones que frecuentemente se encuentran en la secuencia del pseudogen, con el objetivo de determinar qué regiones del gen quimérico corresponden al pseudogen. Se utilizarán las técnicas de PCR-RFLP, PCR alelo específica y PCR mismatch-RFLP, siguiendo la metodología que se utiliza en el Centro Nacional de Genética Médica para el rastreo de mutaciones en el gen CYP21A2. A través del análisis de los resultados se podrá delimitar en forma precisa la zona donde se produjo el punto de quiebre durante la recombinación desigual o la región del gen que sufrió conversión génica.

RESULTADOS

A. Para la realización del objetivo 1 se llevaron a cabo las siguientes tareas:

A.1. Rastreo de las 10 mutaciones más frecuentes del gen CYP21A2: se realizó mediante la amplificación inicial de la secuencia del gen CYP21A2 en 2 fragmentos solapados, mediante la utilización de cebadores específicos del gen. Posteriormente, se utilizaron los 2 fragmentos obtenidos como templados para la realización de PCRs alelo específicas, PCRs mismatch-RFLP, o PCR-RFLP, según la mutación puntual a identificar. Se buscaron en los pacientes las 10 mutaciones puntuales más frecuentes enumeradas en la Tabla 1 en un grupo de 169 pacientes. La metodología descrita, no permite discernir entre la mutación puntual p.G110_Y112delfs o una conversión génica que abarque la región 5' del gen CYP21A2 (5' conversión); y entre pacientes con un genotipo homocigota para una mutación puntual determinada o con una conversión génica que abarque casi o toda la secuencia del gen (macroconversión),

o con delección del gen. La metodología utilizada para terminar de confirmar el genotipo de estos pacientes es el Southern blot. Por lo tanto, aquellos pacientes en los que se identificó la mutación p.G110_Y112delfs o cualquier otra mutación en homocigosis, fueron seleccionados para la realización de Southern por ser candidatos a ser portadores de conversiones o genes quimeras. Del grupo de 169 pacientes en los cuales se rastrearon las 10 mutaciones más frecuentes, se identificaron 57 como posibles portadores de genes de fusión.

A.2. Realización de la técnica de Southern blot:

Mediante el estudio de Southern blot, se pudo determinar el genotipo de los 57 pacientes como se muestra en la siguiente Tabla 2. Se encontraron 18 pacientes portadores de conversiones génicas o de genes quimeras (señalados en la tabla en gris).

B. Para la realización del objetivo 2 se llevaron a cabo las siguientes tareas:

B.1. PCR 8,5 Kb: se amplificación de un fragmento de 8,5 Kb a partir del ADNg de los pacientes portadores de conversiones génicas y genes quimeras, el cual abarcó la región de interés que se quería analizar. Posteriormente, se utilizó ese fragmento como templado para amplificar fragmentos de menor tamaño, los cuales fueron enviados a una empresa para su secuenciación.

Durante la realización del trabajo se modificó la metodología a utilizar, utilizándose la secuenciación directa en vez de PCR-RFLP, PCR alelo específica y PCR mismatch-RFLP para la búsqueda de las mutaciones puntuales en los fragmentos de interés.

B.2. Análisis de las secuencias obtenidas: las secuencias obtenidas fueron contrastadas con la del gen CYP21A2 y la del pseudogen CYP21A21P, y de esa forma se determinó el límite de la región que sufrió conversión génica, o el sitio de ruptura durante la recombinación desigual que origina la delección y el gen quimera. En la Tabla 3 se señala el límite de la región convertida en aquellos pacientes portadores de 5' y macro-conversiones; y la región probable donde se produjo el sitio de ruptura durante la recombinación desigual entre gen y pseudogen, que ocasionó la delección que portan los pacientes.

TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1: mutaciones más frecuentes del gen CYP21A2

MUTACION	UBICACIÓN
p.P30L	exón 1
IVS-13A/C>G	intrón 2
p.G110_Y112delfs	exón 3
p.I172N	exón 4
p.I236N, p.V237E, p.M239K	exón 6
p.V281L	exón 7
p.Q318X	exón 8
p.R356W	exón 8
p.P453S	exón 10

Tabla 2: Genotipos determinados en los pacientes por Southern-blot

NUMERO	GENOTIPO	
	ALELO 1	ALELO 2
1	5'conversión	delección
2	Quimera	p.G110_Y112delfs
3	5'conversión	IVS-13A/C>G
4	5'conversión	p.V281L
5	Quimera	P.Q318X
6	Quimera	p.I172N
7	5'conversión	p.I172N
8	macroconversión	p.V281L
9	p.I172N	p.G110_Y112delfs-p.R356W
10	p.V281L	p.V281L
11	p.V281L	p.V281L
12	p.V281L	p.V281L
13	p.V281L	p.V281L
14	p.V281L	p.V281L
15	Quimera	ND
16	p.V281L	p.V281L
17	Quimera	p.I172N
18	p.V281L	p.V281L
19	5'conversión	p.V281L

20	p.V281L	p.V281L
21	p.V281L	p.V281L
22	p.V281L	p.V281L
23	p.V281L	p.V281L
24	p.I172N	p.G110_Y112delfs
25	5'conversión	p.V281L
26	p.G110_Y112delfs	ND
27	p.V281L	p.V281L
28	p.V281L	p.V281L
29	Quimera	IVS-13A/C>G
30	p.V281L	p.V281L
31	p.V281L	delección
32	p.V281L	p.V281L
33	IVS-13A/C>G	IVS-13A/C>G
34	p.P453S	Del8pb
35	p.V281L	p.V281L
36	5'conversión	p.Q318X
37	Quimera	p.I172N
38	p.V281L	p.V281L
39	p.V281L	p.V281L
40	p.I172N	p.I172N
41	IVS-13A/C>G	delección
42	Quimera	Quimera
43	IVS-13A/C>G	IVS-13A/C>G
44	p.V281L	p.V281L
45	p.V281L	p.G110_Y112delfs
46	p.P453S	p.G110_Y112delfs
47	p.V281L	p.V281L
48	IVS-13A/C>G	IVS-13A/C>G
49	p.V281L	p.V281L
50	macroconversión	p.V281L
51	IVS-13A/C>G	delección
52	IVS-13A/C>G	delección
53	Quimera	p.I172N
54	p.V281L	p.V281L
55	p.V281L	p.V281L
56	p.V281L	p.V281L
57	p.V281L	p.V281L

Tabla 3: Límite de la región convertida o sitio probable de ruptura de las delecciones

N°	GENOTIPO		Límite conversión o sitio de ruptura
	ALELO 1	ALELO 2	
1	5'conversión	delección	c.339C>T ^ c.515T>C (p.I172N) / c.1066C>T (p.R356W) ^ ND
2	Quimera	p.G110_Y112del-fs	c.339C>T ^ c.515T>C (p.I172N)
3	5'conversión	IVS-13A/C>G	c.339C>T ^ c.515T>C (p.I172N)
4	5'conversión	p.V281L	c.339C>T ^ c.515T>C (p.I172N)
5	Quimera	P.Q318X	c.936+11G>C ^ c.952C>T (p.Q318X)
6	Quimera	p.I172N	c.339C>T ^ c.515T>C (p.I172N)
7	5'conversión	p.I172N	c.515T>C (p.I172N) ^ c.547-15C>A
8	macroconversión	p.V281L	c.936+11G>C ^ c.952C>T (p.Q318X)
15	Quimera	ND	c.339C>T ^ c.515T>C (I172N)
17	Quimera	p.I172N	c.936+11G>C ^ c.952C>T (p.Q318X)
19	5'conversión	p.V281L	c.339C>T ^ c.515T>C (p.I172N)
25	5'conversión	p.V281L	c.339C>T ^ c.515T>C (p.I172N)
29	Quimera	IVS-13A/C>G	c.339C>T ^ c.515T>C (p.I172N)
36	5'conversión	p.Q318X	c.339C>T ^ c.515T>C (p.I172N)
37	Quimera	p.I172N	c.1066C>T (p.R356W) ^ ND
42	Quimera	Quimera	c.339C>T ^ c.515T>C (p.I172N)
50	macroconversión	p.V281L	c.952C>T (p.Q318X) ^ c.1066C>T (p.R356W)
53	Quimera	p.I172N	c.936+11G>C ^ c.952C>T (p.Q318X)

ND: mutación no determinada

La numeración utilizada es según la secuencia del gen CYP21A2 publicada por White y col. (1986)¹.

DISCUSIÓN

El análisis del ADN_g de los pacientes, permitió caracterizar la región RCCX donde se encuentra el gen CYP21A2, cuya deficiencia es la principal causa de hiperplasia suprarrenal congénita. Como se mencionó, el rastreo

de las 10 mutaciones más frecuentes del gen, no permite distinguir entre mutaciones en homocigosis, deleciones del gen y macroconversiones, ya que la PCR no detecta hemocigosis. Tampoco permite distinguir entre una deleción de 8 bases en el exón 3 del gen, y una macroconversión que solo abarque la región 5' del gen, debido a la estrategia de amplificación utilizada. Por lo tanto, para culminar con la genotipificación en esos casos, se debe emplear la técnica de Southern-blot, es por esto que esta técnica posee elevada utilidad diagnóstica. Como se consignó en el primer informe de avance, el análisis del ADN de los pacientes mediante la técnica de Southern blot, permitió la identificación de deleciones y macroconversiones génicas, dos de las principales mutaciones encontradas en los pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa. El análisis realizado en este trabajo, permitió culminar con la genotipificación de aquellos pacientes en los que restaba determinar su genotipo luego de la búsqueda de las 10 mutaciones más frecuentes del gen CYP21A2 y detectar aquellos pacientes portadores de deleciones (genes quimeras formados en su región 5' por la secuencia del pseudogen, y en la 3' por la del gen), y macroconversiones. El empleo de una PCR de larga distancia que amplificó toda la secuencia del gen quimera o del convertido, y la posterior secuenciación de la región de interés, posibilitó la determinación de las regiones límite de la conversión y los sitios de ruptura durante la recombinación desigual. De esta manera, hemos caracterizado ambos eventos por primera vez en nuestra población. Mediante la comparación de nuestros resultados con los reportados en la literatura (Lee HH^{2,4}), pudimos establecer que las regiones delimitadas en nuestros pacientes, también han sido reportadas para otras poblaciones. Detectamos las quimeras CH-1 (sitio de ruptura entre c.339C>T ^ c.515T>C (p.I172N)), descrita por Lee y col.², la CH-5 (sitio de ruptura entre c.936+11G>C ^ c.952C>T (p.Q318X), fue descrita por primera vez por Helmborg y col.³, y la CH-8 (sitio de ruptura entre c.1066C>T (p.R356W) ^ ND) descrita por Chen W y col.⁴, cuyo sitio de ruptura es posterior al exón 8, pero no se puede determinar por la elevada identidad de secuencia entre gen y pseudogen en esa región. Debido a esto, es probable que se encuentre río abajo de la región 3'UTR del gen CYP21A2. Todas las quimeras identificadas portan la mutación c.293-13A/C>G y la deleción de 8 bases en el exón 3, ambas mutaciones están asociadas a la forma severa de la patología. Por lo tanto, los pacientes portadores de ellas, poseen un alelo deficiente para la síntesis de la enzima 21-hidroxilasa. Es interesante destacar que los límites determinados para las macroconversiones fueron similares

a los de las deleciones. Se ha sugerido que en estas regiones la presencia de determinados motivos de secuencias, como las *chi*⁵, y los minisatélites⁶ estarían promoviendo la recombinación. El estudio y caracterización de un mayor número de pacientes portadores de estos alelos, brindará mayor información sobre los mecanismos involucrados en la generación de alelos deletéreos.

SINTESIS DEL INFORME

La hiperplasia suprarrenal congénita es un síndrome que se caracteriza por déficit de cortisol y en algunos casos de aldosterona, ambos sintetizados por la corteza adrenal. El 90% de los casos se deben a alteraciones en la enzima 21-hidroxilasa. Se distinguen dos formas clínicas: la clásica (1/15.000), con dos variantes: Virilizante simple y Perdedora de sal, y la no clásica (NC) o de aparición tardía (1/100 a 1/1.000). El gen que codifica para la enzima 21-hidroxilasa es el CYP21A2 (6p21.3), el cual se halla formando parte del módulo RCCX. El módulo comprende parte del gen RP1, los genes del factor 4 del complemento (C4A y C4B), los genes CYP21 y una región del gen TNXB. Aproximadamente un 70% de los cromosomas estudiados contienen 2 módulos, con un gen activo (CYP21A2) en uno de ellos y un pseudogen inactivo (CYP21A1P) con 98% de identidad de secuencia en el otro. Al mismo tiempo, no es infrecuente encontrar cromosomas mono, tri y tetramodulares. La homología existente entre los módulos RCCX repetidos en tándem, incrementa la recombinación desigual, como consecuencia del apareamiento incorrecto de las cromátides. Como consecuencia, se producirán deleciones y duplicaciones que podrán involucrar al módulo del gen o al pseudogen. Además, dependiendo del punto de corte, podrán generarse genes CYP21 con la región 5' del pseudogen y la 3' del gen, denominados quimeras. Hasta la fecha se han reportado 6 genes quiméricos diferentes originados por grandes deleciones. Otro mecanismo involucrado en la generación de alelos deletéreos es el de conversión génica, mediante el cual se realiza una copia no recíproca de una porción de secuencia de una cromátide a otra. Puede abarcar cientos o solo algunas bases. En el primer caso, se originará un gen CYP21 quimérico similar al mencionado anteriormente.

El estudio del módulo se realiza mediante la técnica de Southern-blot, utilizando la restricción con las enzimas TaqI y BglII y sondas para los genes CYP21, C4 y TNX. El análisis del patrón de restricción obtenido utilizando sondas para CYP21, C4 y TNX, conjuntamente con la información de la bús-

queda de las 10 mutaciones más frecuentes, permite dilucidar en la mayor parte de los casos, la estructura y composición modular. Sin embargo algunos genes quiméricos no pueden ser completamente diferenciados. En estos casos la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) permitiría la caracterización de estos últimos, a través de la amplificación diferencial de fragmentos de gran tamaño que abarquen la secuencia de fusión entre el pseudogen y el gen.

El objetivo de este trabajo fue la caracterización del módulo RCCX en una muestra de pacientes, y la detección de portadores de genes quimeras y de conversiones génicas. Posteriormente, se caracterizaron detalladamente los alelos portadores de genes de fusión y conversiones mediante la amplificación de fragmentos de gran tamaño y secuenciación.

Esta caracterización permitió detectar 3 genes quimeras (CH-1, CH-5 y CH-8), los cuales ya han sido reportados en otras poblaciones. Por otra parte, determinamos que los límites de las regiones convertidas, son similares a las regiones donde se produce la ruptura durante la recombinación desigual, lo que sugeriría que ambos eventos, compartirían algún tipo de regulación, como puede ser la presencia de determinadas secuencias consenso en el ADN.

RESUMEN EN INGLES

Congenital adrenal hyperplasia is characterized by decreased synthesis of cortisol by the adrenal gland. 95% of cases are due to deficiency in the enzyme 21-hydroxylase. The enzyme is encoded by the CYP21A2 gene, located within the module RCCX. The aims of the study were the characterization of the RCCX region, and the detailed characterization of chimeric or converted genes in our population. Molecular characterization of the region RCCX was done by Southern blot technique, using the restrictions enzymes TaqI and BglII, and probes for genes CYP21, TNX and C4. The chimeric or converted genes were studied by long range PCR, followed by sequencing of the region of interest. The techniques used were adequate to achieve the objectives proposed. Molecular characterization of the region RCCX allowed us to demonstrate a high variability in gene and modular composition in patients of our population. This characterization allowed the detection of three genes chimeras (CH-1, CH-5 and CH-8), which have already been reported in other populations. Furthermore, we determined that the converted region boundary, are similar to the regions where the break occurs during unequal

crossovers, suggesting that both events, share some type of regulation, such as the presence of certain consensus DNA sequences.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. White P y col. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5111-5115.
2. Lee HH y col. (2002) *J Hum Genet.* 47, 517-522.
3. Helmberg A y col. (1992) *DNA Cell Biol.* 11, 359-368
4. Chen W y col. (2012) *Clin Chem.* 58, 421-430
5. Jeffreys AJ y col. (1985) *Nature.* 314, 67-73
6. Lee HH y col. (2004) *J Hum Genet.* 49, 65-72

PARTICIPACIÓN DE LA POBLACIÓN DE MONOCITOS EN EL DESARROLLO DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

Gabriela C Fernandez, Cecilia Analía Panek, Marina S Palermo

División Inmunología de la Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad de comienzo agudo con anemia hemolítica microangiopática, plaquetopenia y daño renal, que habitualmente puede seguir o no a un episodio de diarrea con o sin sangre, principalmente en lactantes, y en niños de la primera infancia. Las manifestaciones más comunes son: palidez, petequias, hematomas, oliguria, edema, hipertensión arterial, y cambios neurológicos como letargia o convulsiones¹⁰.

El SUH está ampliamente distribuido en el mundo¹². En América del Sur el problema se concentra en países del Cono Sur, principalmente Argentina, Chile y Uruguay¹⁶. En Chile y Uruguay las tasas son similares a las comunicadas por los países industrializados. Sin embargo, en Argentina el SUH es endémico, y constituye la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica, siendo además responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes.

La forma típica de SUH está asociada a infecciones causadas por organismos Gram-negativos productores de toxina Shiga (STEC)^{13,21,22}, siendo el serotipo más frecuente en Argentina el O157:H7^{15,17}.

Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, han sido señalados como los principales reservorios de STEC^{17,20} y la transmisión se realiza a través del consumo de alimentos contaminados, principalmente elaborados a base de carne picada y también leche no pasteurizada²⁵. La contaminación fecal de agua y otros alimentos (embutidos fermentados, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, entre otros), y la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos han sido señaladas como rutas de infección. Otras formas de transmisión son: el contacto directo del hombre con los ani-

males, y persona a persona por la ruta fecal-oral, pues la dosis infectiva es muy baja, menos de 100 bacterias pueden causar enfermedad.

Desde hace varios años, nuestro grupo trabaja en conocer los mecanismos fisiopatogénicos del SUH y la participación de la respuesta inmune en el desarrollo de la forma completa. Demostramos que las respuestas pro- y anti-inflamatoria ejercen un efecto potenciador o protector, respectivamente, sobre la toxicidad renal específica de la Stx¹⁸. Hemos contribuido significativamente a definir la participación de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) en la patogénesis del SUH^{4-6,8,9}. Siendo células con alto poder citotóxico potencian inespecíficamente el daño endotelial iniciado por la Stx a través de la secreción de enzimas, especies reactivas del oxígeno y citoquinas.

Si bien los PMN son agentes patogénicos directos del SUH, a través de la secreción de distintos mediadores con alto poder tóxico para el endotelio (enzimas proteolíticas, radicales libres, anión superóxido)^{4,6}, los monocitos (Mo) también podrían contribuir al daño endotelial inducido por la Stx no sólo a través de la secreción sistémica de citoquinas inflamatorias (fuertes inductoras del receptor específico para la Stx, el Gb³), sino también a través de la regulación de la respuesta inflamatoria. En este sentido, demostramos que la toxicidad de la Stx tipo2 está significativamente disminuida en ausencia de los macrófagos, sugiriendo que esta población es importante para inducir daño tisular, probablemente a través de la producción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1b¹⁹.

Asimismo, hemos reportado que los Mo periféricos de los pacientes con SUH en la etapa aguda presentan alteraciones en moléculas de superficie asociadas a distintas funciones de estas células. En este sentido se observó una menor expresión del CD14 (molécula fundamental en la respuesta al lipopolisacárido o LPS, componente principal de la pared bacteriana de los organismos Gram-negativos), el HLA-DR (asociado a la presentación antigénica), el CD64 o Fc γ RI (receptor tipo I para la porción Fc de las IgG) y el CD11b (molécula de adhesión). Por otra parte, se observó un aumento del subset de Mo CD14⁺ CD16⁺, tradicionalmente considerado como pro-inflamatorio, con características parecidas a macrófagos y/o células dendríticas⁷.

El **objetivo general** de este proyecto es estudiar la participación de la población monocítica en el desarrollo del SUH. Nuestra hipótesis de trabajo es que este tipo celular podría contribuir al daño endotelial inducido por la Stx a través de la secreción de citoquinas y/o regulando la respuesta inflamatoria.

MUESTRAS Y METODOLOGÍA

Las muestras de pacientes en el período agudo del SUH serán obtenidas luego de obtener el consentimiento de los padres y/o tutores. 4 ml de sangre serán extraídos en tubos con EDTA por punción venosa, previamente a que los pacientes reciban transfusiones y/o diálisis. Las muestras serán obtenidas del Hospital Municipal del Niño de San Justo y del Hospital de niños “Ricardo Gutiérrez”. Como controles se utilizarán niños sanos y niños que presenten infecciones bacterianas no relacionadas con el SUH.

Se estudiará:

- 1) la modulación en distintas moléculas antigénicas de la superficie del Mo en condiciones basales y luego de la incubación con LPS. Se analizará la expresión de los marcadores CD14, HLA-DR y el porcentaje de células CD16.

Método: 2×10^6 células totales de sangre periférica fueron incubadas en presencia o ausencia de LPS (1 mg/ml) durante 4 hs a 37°C, 5% CO₂. Transcurrido ese tiempo las células fueron centrifugadas e incubadas con los anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos durante 30 min a 4°C. Los glóbulos rojos fueron lisados con un buffer de lisis comercial (BD) y las células resuspendidas en ISOFLOW. La fluorescencia se determinó utilizando un citómetro de flujo. Los Mo fueron identificados de acuerdo a su positividad para el marcador CD14.

- 2) la producción de distintas citoquinas en condiciones basales o luego de la incubación con LPS. Se midió TNF- α como citoquinas representativas de un estado pro-inflamatorio y la IL-10 como representantes de un estado anti-inflamatorio.

Método: los sobrenadantes de las células tratadas como en el punto 1 fueron colectados y se emplearon kits sea comerciales para la determinación de las citoquinas.

- 3) la producción de citoquinas en los dos subsets principales de Mo periféricos (CD16+ y CD16-) utilizando la medición intracelular con anticuerpos específicos por citometría de flujo.

Método: 2×10^6 de células totales de sangre entera fueron diluidas a un volumen final de 0.5 ml con solución salina en tubos de polipropileno e incuba-

das en presencia de 1 mg/ml de LPS y brefeldina A (10 mg/ml, para evitar la secreción de las citoquinas a determinar) por 4 h a 37°C en 5% CO₂. Luego, las células fueron incubadas con los anticuerpos dirigidos contra CD14 y CD16 por 30 min a temperatura ambiente. Los eritrocitos fueron lisados, y las células resuspendidas en 0.2 ml de paraformaldeído 0.5% y guardadas a 4°C. El día de adquisición las células fueron lavadas 2 veces con 0.1% saponina en PBS 1x e incubadas con los anticuerpos dirigidos contra TNF- α e IL-10 por 30 min a temperatura ambiente. En todos los casos, se utilizaron los isotipos correspondientes. La fluorescencia fue determinada por citometría de flujo en 100.000 eventos para cada muestra.

RESULTADOS

Los pacientes con SUH se agruparon de acuerdo a su gravedad en dos grupos: SUH 1 corresponde a los casos leves, sin anuria y sin requerimientos de diálisis; y SUH 2+3 correspondientes a los casos moderados y graves que requirieron diálisis porque mostraron algún grado de insuficiencia renal. Asimismo, como grupos controles se utilizaron niños sanos (HC) o niños con infecciones bacterianas no relacionadas al SUH (IC).

Se encontró que el porcentaje de Mo CD16+ estaba incrementado tanto en IC y SUH 2+3 grupos, pero se encontraron porcentajes normales en los niños de SUH 1 (Figura 1A). Sin embargo, teniendo en cuenta que SUH 1, SUH 2+3 e IC mostraban un mayor número absoluto de Mo, las cifras absolutas resultantes de Mo CD16+ en los tres grupos clínicos resultaron superiores al comparar con HC (Figura 1B). Además, los Mo CD16+ se caracterizaron de acuerdo con su expresión de CD62L. Este análisis (Figura 1C) reveló dos subpoblaciones adicionales dentro del subset CD16+ (CD16+ CD62L+ y CD16+ CD62L-) que se encontraron aumentadas en los grupos SUH 2+3 e IC. Curiosamente, los Mo CD16+ CD62L+ mostraron mayor FSC/SSC que aquellos Mo CD16+ CD62L-. Los niveles de expresión de CD14 en las dos subpoblaciones CD16+ fue diferente en SUH 2+3 (Media de fluorescencia del CD14: CD16+ CD62L+ = 1781 ± 174 , CD16+ CD62L- = 2273 ± 290 ; $p < 0,05$).

La capacidad de los Mo para responder a un desafío de LPS fue evaluada midiendo los cambios en la expresión de diferentes moléculas de superficie. Como se puede observar en la parte A de la figura 2, el LPS aumentó la expresión del CD14 en los Mo de los grupos HC y HUS 1, mientras que no se observaron cambios en los grupos HUS 2+3 e IC. Además, aunque todos los

grupos incrementaron su expresión de HLA-DR luego del tratamiento con LPS, el incremento observado para pacientes HUS1 fue el más alto y el observado para el grupo HUS 2+3 fue el más bajo (Fig 2B). Además, el LPS indujo una reducción en el porcentaje de Mo CD16+ en todos los grupos, pero la mayor reducción se obtuvo para HUS 1 (Fig 2C). Curiosamente, los Mo que conservaron su expresión de CD16 después del tratamiento con LPS fueron las células con un perfil de altos de FSC/SSC (Fig 2D), similares a los Mo que fueron CD16+ CD62L+ en condiciones basales (ver figura informe 1). El porcentaje de células apoptóticas, analizadas por incubación con anexina V, fue similar en condiciones basales o después de la incubación de LPS (datos no mostrados), indicando que los cambios cuantitativos en el porcentaje de células CD16+ no eran debido a la apoptosis. Además, la disminución en la expresión del CD16 fue específica para Mo, dado que el tratamiento con LPS no modificó el porcentaje o expresión de CD16 en neutrófilos (datos no mostrados). Del mismo modo en todos los grupos clínicos, después del tratamiento con LPS toda la población de Mo perdió completamente su expresión en superficie del CD62L (datos no mostrados).

A continuación medimos la producción de citoquinas intracelulares por citometría de flujo para cuantificar el número de Mo CD16+ o CD16- (dentro de la población de Mo CD14+) que estaban produciendo una citoquina particular (Figura 3). Elegimos TNF-a e IL-10 como ejemplos típicos de citoquinas pro y anti-inflamatorias, respectivamente. También determinamos la producción intracelular de TNF-a e IL-10 en respuesta a lipopolisacáridos o LPS (Figura 4).

Como se muestra en la figura 3A el número de Mo CD16+ que producían TNF-a e IL-10 en condiciones basales fue mayor en los grupos clínicos de niños con SUH severo (HUS 2+3) y aquellos con infecciones no relacionadas al SUH (IC) que en niños sanos (HC) o SUH leves (HUS 1), grupos que mostraron valores similares. Para la subpoblación CD16- el número de células productoras de TNF-a fue similar en todos los grupos clínicos, pero los Mo CD16- productores

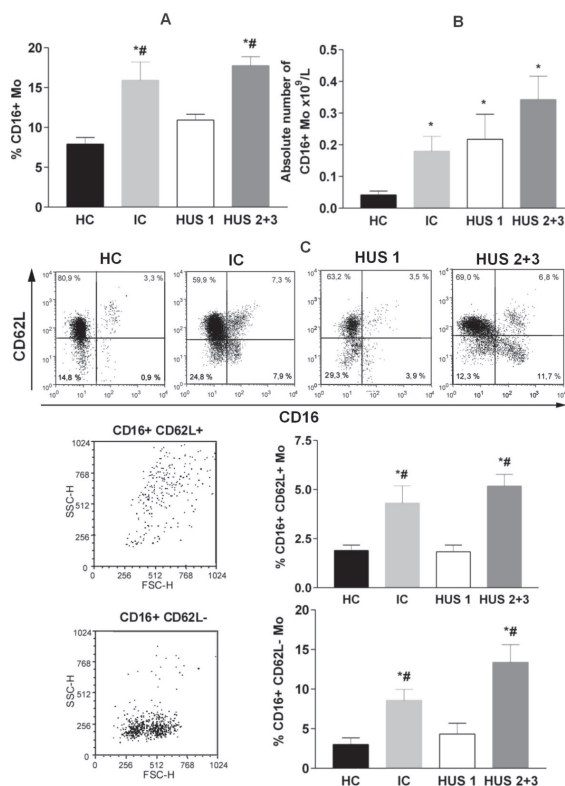


Figura 1. Caracterización de Mo CD16+ en pacientes de SUH. 2 x 10⁶ células totales de sangre entera fue marcada con anticuerpos conjugados de fluorochrome contra CD14, CD16 y CD62L y el porcentaje de células positivas para CD62L y CD16 fue evaluado dentro del gate de Mo (CD14+) por citometría de flujo. A-porcentaje de Mo CD16+ en los grupos clínicos. B - número absoluto de Mo CD16+. El porcentaje de Mo CD16+ fue convertido en números absolutos de acuerdo con el recuento absoluto de Mo. C- Parte superior: gráficos de puntos representativos de un HC, IC, HUS 1 y SUH 2+3, mostrando la expresión de las moléculas de CD16 y CD62L. Parte inferior a la izquierda: gráfico de puntos representativo de un niño HUS 2+3 mostrando los perfiles de tamaño (FSC) vs complejidad (SSC) de las subpoblaciones CD16+ CD62L+ y CD16+ CD62L-. Parte inferior a la derecha: porcentaje de los subsets CD16+ CD62L+ y CD16+ CD62L- en todos los grupos clínicos. *p<0.05 vs HC, #p<0.05 vs HUS 1.

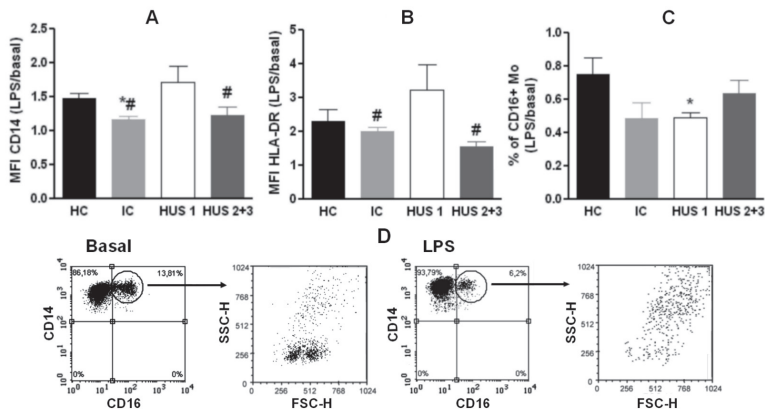


Figura 2. Respuesta de Mo de pacientes con HUS a LPS. 2×10^6 leucocitos totales de sangre periférica fue incubada en ausencia (basal) o presencia de LPS (1 μ g/ml) por 4 h y, a continuación, marcada con los anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos. Luego de la lisis de los eritrocitos la intensidad de la fluorescencia media (MFI) del CD14 (A) y HLA-DR (B) y el porcentaje de Mo totales CD16+ (C) fue determinado por citometría de flujo en Mo (CD14⁺). Los resultados se expresaron como el valor obtenido en la presencia de LPS sobre que obtuvo en su ausencia (LPS/basal). D. Dot plots representativos de un niño HUS 2+3 que muestra el perfil FSC/SSC de la subpoblación de Mo CD16+ en condiciones basales y con LPS. * $p < 0.05$ vs. HC, $p \# < 0.05$ vs. HUS 1.

de IL-10 se encontraron aumentados en HUS 1, HUS 2+3 e IC (figura 3B). Es importante observar que, sobre todo para HUS 2+3 e IC, el número absoluto de células CD16+ produciendo TNF- α e IL-10 fue significativamente superior (cinco veces) comparado con las células CD16⁻.

Dado que el LPS producía la disminución (internalización) del marcador CD16, consideramos que el análisis de la respuesta al LPS en cuanto a la producción de citoquinas debería hacerse considerando a toda la población de monocitos CD14⁺ (Figura 3C). Así, observamos una estimulación de la producción de TNF- α en los grupos HUS 1, HUS 2+3 e IC. Para IL-10 mientras que los pacientes HUS 1 mostraron valores similares al grupo HC, los grupos HUS 2+3 e IC mostraron aumentos significativos en los números de células productoras de esta citoquina. Sin embargo, cuando se evaluó la respuesta al LPS como la relación entre los números en respuesta al LPS y basales (LPS/basal) para cada citoquina, observamos que todos los grupos respondieron de forma similar no encontrando diferencias entre grupos.

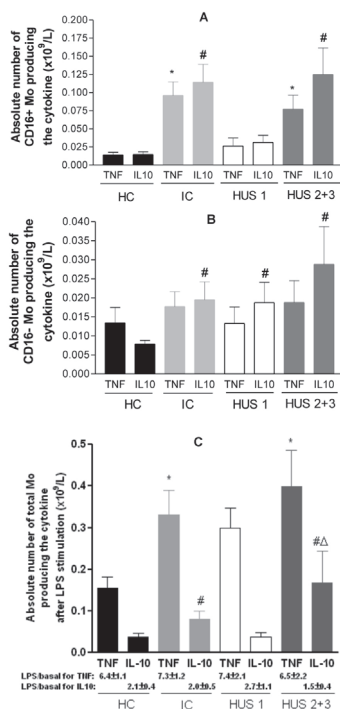


Figura 3. Producción de citoquinas intracelulares. 2×10^6 de células totales de sangre entera fueron diluidas a un volumen final de 0.5 ml con solución salina en tubos de polipropileno e incubadas en ausencia (A y B) o en presencia de 1 mg/ml de LPS (C) y brefeldina A (10 mg/ml, para evitar la secreción de las citoquinas a determinar) por 4 h a 37°C en 5% CO_2 . Luego, las células fueron incubadas con los anticuerpos dirigidos contra CD14 y CD16 por 30 min a temperatura ambiente. Los eritrocitos fueron lisados, y las células resuspendidas en 0.2 ml de paraformaldeído 0.5% y guardadas a 4°C . El día de adquisición la células fueron lavadas 2 veces con 0.1% saponina en PBS 1x e incubadas con los anticuerpos dirigidos contra TNF- α e IL-10 por 30 min a temperatura ambiente. En todos los casos, se utilizaron los isotipos correspondientes. La fluorescencia fue determinada por citometría de flujo en 100.000 eventos para cada muestra. A- Número absoluto de Mo CD16+ que producen TNF- α e IL-10 en condiciones basales. B- Número absoluto de Mo CD16+ que producen TNF- α e IL-10 en presencia de LPS. C- Número absoluto de Mo CD14+ que producen TNF- α e IL-10 en presencia de LPS. También se muestra las veces de aumento en el número de Mo CD14+ productores de citoquinas por el LPS expresado como la relación entre LPS/basal. A y B- * $p < 0.05$ vs HC TNF and HUS 1 TNF, # $p < 0.05$ vs HC IL-10 and HUS 1 IL-10. C- * $p < 0.05$ vs HC TNF, # $p < 0.05$ vs HC IL-10, $\Delta p < 0.05$ vs. HUS 1 IL-10.

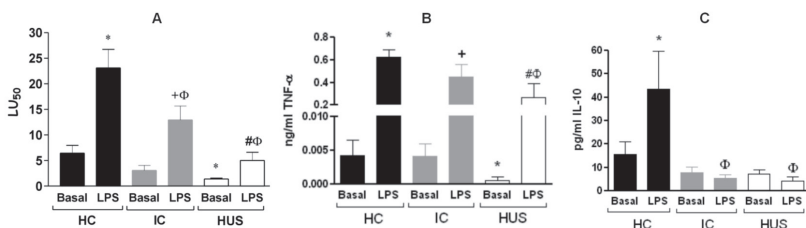


Figura 4. Medición de TNF-α e IL-10 secretados. Los sobrenadantes de los medios de cultivo fueron colectados y la capacidad biológica del TNF-α (A) fue medida usando las células sensibles a TNF-α, L929. Los resultados se expresaron como las unidades líticas 50 (LU₅₀). Las cantidades liberadas al sobrenadante de TNF-α e IL-10 fueron medidas por ELISA (B y C, respectivamente). * $p < 0.05$ vs HC basal, + $p < 0.05$ vs IC basal, # $p < 0.05$ vs HUS basal, $F_p < 0.05$ vs HC LPS.

Dado que la técnica de medición intracelular de citoquinas evalúa la habilidad para producir la citoquina en cuestión, pero no considera la capacidad de la célula de liberar la citoquina al medio, investigamos la presencia de las citoquinas TNF-α e IL-10 en el sobrenadante de cultivos de sangre entera luego de 4 hs en condiciones basales o en respuesta al lipopolisacárido (LPS) utilizando ELISAS comerciales para ambas citoquinas y también un ensayo biológico para el caso del TNF-α. Dado que los pacientes con SUH no mostraron diferencias entre grupos de severidad, el grupo fue analizado conjuntamente.

Como muestra la figura 4A y B, la actividad biológica y la cantidad de TNF-α fue menor en los pacientes con SUH tanto en condiciones basales como en respuesta al LPS, siendo estas diferencias estadísticamente significativas respecto a los niños sanos (HC).

A pesar de que en condiciones basales los niveles de IL-10 fueron similares en todos los grupos, solo el grupo HC presentó un aumento significativo de IL-10 en respuesta al LPS (Fig 4C).

CONCLUSIONES

Los Mo son heterogéneos en morfología, fenotipo y la función (29). En particular, la expresión diferencial de los receptores CD14 y CD16 se ha utilizado para distinguir y clasificar diferentes subpoblaciones de Mo¹¹. Alrededor del 90% de MO de la sangre periférica se compone de células

CD14+ CD16- (generalmente considerados como “Mo clásicos”). A su vez, en nuestro estudio, hemos identificado heterogeneidad dentro de los Mo CD16+, encontrando dos poblaciones de Mo CD16+ que diferían en tamaño y expresión de CD62L: grandes CD16+ CD62L+ y pequeños CD16+ CD62L-, ambos aumentados en los casos severos de SUH (SUH 2+3), pero no en los casos leves (SUH 1) de esta enfermedad y en niños con infecciones bacterianas (IC). La pérdida del CD62L en los leucocitos ha sido asociada a la activación de las células (3, 26), y se postula como un factor importante en el fenómeno de leucocitosis (27). Por lo tanto, es posible que el aumento del subconjunto de Mo CD16+ CD62L- observado en los casos graves de SUH en condiciones basales represente Mo que han sido activados en el curso de la infección y han sido retenidos en la circulación periférica. Estos resultados están de acuerdo con un trabajo nuestro anterior, en el que se encontró una correlación negativa entre la expresión de CD62L en Mo y la gravedad del SUH (24). En conjunto, estas observaciones apoyan el concepto de una fuerte estimulación inmune asociada con casos graves de SUH, mientras que una estimulación inmune más débil puede representar mejor la situación del SUH leve. En línea con esta hipótesis, Mo de pacientes leves mostraron un patrón funcional y fenotípico mucho más similar a los niños sanos. Sin embargo, si esta estimulación inmune diferencial está directamente asociada con el pronóstico de la enfermedad no está claro.

Además observamos un aumento del número de Mo CD16+ que producían tanto TNF- α e IL-10 en condiciones basales. En este sentido, a causa de estos incrementos coordinados, no hay evidencia de un cambio hacia un estado proinflamatorio de los niños graves SUH.

A través de la estimulación *ex vivo* Mo con LPS, demostramos por primera vez que el LPS produce una disminución en el marcador CD16+ de Mo en cultivos de sangre entera. De hecho, la molécula CD16 se perdió en la subpoblación pequeña CD16+ CD62L-. Además, esta disminución fue específica para Mo y no fue causada por apoptosis. Mientras que en condiciones basales el principal contribuyente a la producción de citoquinas fue el subconjunto CD16+, la pérdida del CD16 hace difícil estudiar la contribución real de estos Mo a la producción de citoquinas después de la incubación con LPS. Por lo tanto, hemos utilizado toda la población CD14+ para analizar la producción de citoquinas intracelulares en respuesta a LPS. Utilizando este enfoque, no se observaron diferencias entre grupos dado que el LPS provocó un aumento similar en todos de pacientes tanto para el TNF- α y la IL-10. Sin embargo, cuando se comparó la respuesta de LPS

mediendo la modulación de las moléculas de superficie, se observó que, a pesar de que los Mo de pacientes graves de SUH no eran completamente refractarios a la estimulación con LPS, mostraron más resistencia a sus efectos moduladores en comparación con HC. Por el contrario, los casos leves de SUH mostraron las mayores respuestas. Podemos hipotetizar que la activación de un estímulo inicial fuerte o más prolongado (productos bacterianos o mediadores de la inflamación) inducen una fuerte activación de Mo que a su vez quedan parcialmente insensible a la estimulación posterior (1, 2). Por lo tanto, los Mo de los casos más graves pueden representar células con una menor capacidad de responder a LPS. Por el contrario, señales más débiles pueden primar a los Mo de los casos leves a ser más capaces de montar una respuesta LPS.

La capacidad de secreción de citoquinas antes y después de la estimulación se vio afectada parcialmente en toda la población SUH. La contribución de las otras células (neutrófilos es decir) a las citocinas medida puede ser insignificante, ya Mo son los principales productores de estas citoquinas, y además no se detectaron las citoquinas medidas en otras poblaciones de sangre entera utilizando anticuerpos intracelulares.

Una disregulación en la vía de señalización de LPS en el Mo de los pacientes SUH puede explicar los bajos niveles de citoquinas. Sin embargo, la medición de las citoquinas intracelulares utilizando anticuerpos reveló una capacidad intacta de Mo para producir estas moléculas, tanto en condiciones basales y LPS. Estos resultados aparentemente contradictorios son difíciles de interpretar, teniendo en cuenta que los niveles elevados de citoquinas como la IL-10, están presentes en el suero de pacientes con SUH (14, 23). Por otra parte, se ha informado *in vitro* que Stx y/o LPS conduce a la transcripción y la liberación de TNF- α en Mo humanos normales (28). Por lo tanto, el hecho de que Mo de pacientes con SUH no mostraron aumento en la liberación de citoquinas, cuando un número equivalente de leucocitos fueron analizados en los diferentes grupos, se puede atribuir a que el tiempo transcurrido desde el inicio de la diarrea, y/o la retención de Mo más reactivos en los tejidos inflamados, dejando a las células más desactivada en la circulación periférica. En este sentido, la detección inmunohistoquímica de leucocitos macrófagos CD68+ en secciones de riñón de pacientes con SUH apoya el concepto de que los Mo son, de hecho, retenidos en los tejidos (24). Una vez más, una desensibilización causada por la activación anterior también puede explicar el deterioro parcial en la secreción de citoquinas. Teniendo en cuenta todo esto, es posible que el aumento del número de Mo con la capacidad de pro-

ducir estas moléculas, observado especialmente en los niños graves SUH, pueda representar mecanismos de compensación para equilibrar las disfunciones potenciales en los Mo.

En conclusión, los pacientes con SUH mostraron una secreción de citoquinas alterada, a pesar de la capacidad conservada para producir estas moléculas. Además, en casos graves de SUH se observó una disminución de la capacidad de movilizar receptores de superficie en respuesta a LPS y en general el comportamiento de Mo del grupo grave fue similar al observado en niños con otras infecciones bacterianas. Por otro lado, la respuesta a LPS en casos leves fue similar a la que se observa en HC. A diferencia de respuesta respecto a la gravedad de los pacientes con SUH también se ha observado en los neutrófilos⁴.

RESUMEN

Propósito: La interacción de la toxina Shiga (Stx) y/o Lipopolisacárido (LPS) con monocitos (Mo) puede ser fundamental para la patogénesis de hemolítico urémico síndrome (SUH), proporcionando las citoquinas necesarias para sensibilizar las células endoteliales a la acción de Stx. Previamente hemos demostrado alteraciones fenotípicas en Mo de los pacientes de SUH, incluyendo aumento de número de Mo CD16+. Nuestro objetivo fue investigar la producción de citoquinas en Mo de pacientes con SUH.

Métodos: Evaluamos la producción intracelular de TNF-a e IL-10 y su secreción en los diferentes subsets de Mo en pacientes con SUH leves (SUH 1) y moderados/severo (SUH 2+3). Se estudiaron como controles niños sanos (HC) e infectados (IC). También estudiamos la capacidad de respuesta de los Mo hacia el LPS, midiendo la modulación de la expresión de moléculas de superficies de los Mo y de la producción de citoquinas.

Resultados: en condiciones basales, la medición intracelular de TNF-a e IL-10 reveló un mayor número de Mo productores de citocinas en los grupos SUH 2+3 e IC. El LPS provocó un aumento similar en el número de Mo productores de TNF-a y IL-10 para todos los grupos. Sin embargo, al evaluar la liberación de TNF-a y IL-10, encontramos una capacidad disminuida de secreción en el grupo entero de SUH e IC frente a HC en condiciones basales y luego de la incubación con LPS. Asimismo, una menor respuesta de Mo a LPS en SUH 2+3 e IC se observó cuando se estudió la modulación de marcadores de superficie.

Conclusión: Estos resultados indican que los Mo de casos severos de SUH, similar al grupo IC pero diferentes para casos leves de SUH, presentan cambios funcionales en las subpoblaciones de Mo y respuestas anormales a LPS.

ABSTRACT

Purpose: The interaction of Shiga toxin (Stx) and/or lipopolysaccharide (LPS) with monocytes (Mo) may be central to the pathogenesis of Hemolytic Uremic Syndrome (HUS), providing the cytokines necessary to sensitize endothelial cells to Stx action. We have previously demonstrated phenotypical alterations in Mo from HUS patients, including increase number of CD16+ Mo. Our aim was to investigate cytokine production in Mo from HUS patients.

Methods: We evaluated TNF- α and IL-10 intracellular contents and secretion in the different Mo subsets in mild (HUS 1) and moderate/severe (HUS 2+3) patients. As controls we studied healthy (HC) and infected children (IC). We also studied Mo responsive capacity towards LPS, measuring the modulation of Mo surface molecules and cytokine production.

Results: In basal conditions, the intracellular measurement of TNF- α and IL-10 revealed that the highest number of cytokine-producing Mo was found in HUS 2+3 and IC, whereas LPS caused a similar increase in TNF- α and IL-10-producing Mo for all groups. However, when evaluating the release of TNF- α and IL-10 we found a diminished secretion capacity in the entire HUS group and IC compared to HC in basal and LPS conditions. Similarly, a lower Mo response to LPS in HUS 2+3 and IC groups was observed when surface markers were studied.

Conclusion: These results indicate that Mo from severe cases of HUS, similar to IC but different to mild HUS cases, present functional changes in Mo subpopulations and abnormal responses to LPS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alves-Rosa, F., M. Vulcano, M. Beigier-Bompadre, G. Fernandez, M. Palermo, and M. A. Isturiz. 2002. Interleukin-1 β induces in vivo tolerance to lipopolysaccharide in mice. *Clin Exp Immunol* 128:221-228.
2. Cavillon, J. M., C. Adrie, C. Fitting, and M. Adib-Conquy. 2003. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? *J Endotoxin Res* 9:101-107.

3. Chen, A., P. Engel, and T. F. Tedder. 1995. Structural requirements regulate endo-proteolytic release of the L-selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes. *J Exp Med* 182:519-530.
4. Fernandez, G. C., S. A. Gomez, M. V. Ramos, L. Bentancor, R. J. Fernandez-Brando, V. I. Landoni, L. Lopez, F. Ramirez, M. Diaz, M. Alduncin, I. Grimoldi, R. Exeni, M. A. Isturiz, and M. S. Palermo. 2007. The functional state of neutrophils correlates with the severity of renal dysfunction in children with Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatr Res* 61:123-128.
5. Fernandez, G. C., S. A. Gomez, C. J. Rubel, L. V. Bentancor, P. Barrionuevo, M. Alduncin, I. Grimoldi, R. Exeni, M. A. Isturiz, and M. S. Palermo. 2005. Impaired neutrophils in children with the typical form of hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 20:1306-1314.
6. Fernandez, G. C., M. F. Lopez, S. A. Gomez, M. V. Ramos, L. V. Bentancor, R. J. Fernandez-Brando, V. I. Landoni, G. I. Dran, R. Meiss, M. A. Isturiz, and M. S. Palermo. 2006. Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia. *Clin Exp Immunol* 146:76-84.
7. Fernandez, G. C., M. V. Ramos, S. A. Gomez, G. I. Dran, R. Exeni, M. Alduncin, I. Grimoldi, G. Vallejo, C. Elias-Costa, M. A. Isturiz, and M. S. Palermo. 2005. Differential expression of function-related antigens on blood monocytes in children with hemolytic uremic syndrome. *J Leukoc Biol* 78:853-861.
8. Fernandez, G. C., C. Rubel, P. Barrionuevo, L. Lopez, F. Ramirez, M. Diaz, M. A. Isturiz, and M. S. Palermo. 2002. Phenotype markers and function of neutrophils in children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 17:337-344.
9. Fernandez, G. C., C. Rubel, G. Dran, S. Gomez, M. A. Isturiz, and M. S. Palermo. 2000. Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome. *Clin Immunol* 95:227-234.
10. Gianantonio, C., M. Vitacco, F. Mendilaharsu, A. Rutty, and J. Mendilaharsu. 1964. The Hemolytic-Uremic Syndrome. *J Pediatr* 64:478-491.
11. Grage-Griebenow, E., H. D. Flad, and M. Ernst. 2001. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 69:11-20.
12. Griffin, P. M., and R. V. Tauxe. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 13:60-98.
13. Karmali, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2:15-38.
14. Litalien, C., F. Proulx, M. M. Mariscalco, P. Robitaille, J. P. Turgeon, E. Orrbine, P. C. Rowe, P. N. McLaine, and E. Seidman. 1999. Circulating inflammatory cytokine levels in hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 13:840-845.
15. Lopez, E. L., M. Diaz, S. Grinstein, S. Devoto, F. Mendilaharsu, B. E. Murray, S. Ashkenazi, E. Rubeglio, M. Woloj, M. Vasquez, and et al. 1989. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis* 160:469-475.
16. Lopez, E. L., V. Prado-Jimenez, M. O'Ryan-Gallardo, and M. M. Contrini. 2000. Shigella and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* causing bloody diarrhea in Latin America. *Infect Dis Clin North Am* 14:41-65, viii.

17. Meichtri, L., E. Miliwebsky, A. Gioffre, I. Chinen, A. Baschkier, G. Chillemi, B. E. Guth, M. O. Masana, A. Cataldi, H. R. Rodriguez, and M. Rivas. 2004. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol* 96:189-198.
18. Palermo, M., F. Alves-Rosa, C. Rubel, G. C. Fernandez, G. Fernandez-Alonso, F. Alberto, M. Rivas, and M. Isturiz. 2000. Pretreatment of mice with lipopolysaccharide (LPS) or IL-1 β exerts dose-dependent opposite effects on Shiga toxin-2 lethality. *Clin Exp Immunol* 119:77-83.
19. Palermo, M. S., M. F. Alves Rosa, N. Van Rooijen, and M. A. Isturiz. 1999. Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethality of Shiga toxin-2 in a mouse model. *Clin Exp Immunol* 116:462-467.
20. Parma, A. E., M. E. Sanz, J. E. Blanco, J. Blanco, M. R. Vinas, M. Blanco, N. L. Padola, and A. I. Etcheverria. 2000. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. *Eur J Epidemiol* 16:757-762.
21. Paton, J. C., and A. W. Paton. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 11:450-479.
22. Proulx, F., E. G. Seidman, and D. Karpman. 2001. Pathogenesis of shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res* 50:163-171.
23. Proulx, F., J. P. Turgeon, C. Litalien, M. M. Mariscalco, P. Robitaille, and E. Seidman. 1998. Inflammatory mediators in *Escherichia coli* O157:H7 hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 17:899-904.
24. Ramos, M. V., G. C. Fernandez, N. Patey, P. Schierloh, R. Exeni, I. Grimoldi, G. Vallejo, C. Elias-Costa, M. Del Carmen Sasiain, H. Trachtman, C. Combadiere, F. Proulx, and M. S. Palermo. 2007. Involvement of the fractalkine pathway in the pathogenesis of childhood hemolytic uremic syndrome. *Blood* 109:2438-2445.
25. Rivas, M., M. G. Caletti, I. Chinen, S. M. Refi, C. D. Roldan, G. Chillemi, G. Fiorilli, A. Bertolotti, L. Aguerre, and S. Sosa Estani. 2003. Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. *Emerg Infect Dis* 9:1184-1186.
26. Smalley, D. M., and K. Ley. 2005. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med* 9:255-266.
27. Tedder, T. F., D. A. Steeber, and P. Pizcueta. 1995. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med* 181:2259-2264.
28. van Setten, P. A., L. A. Monnens, R. G. Verstraten, L. P. van den Heuvel, and V. W. van Hinsbergh. 1996. Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. *Blood* 88:174-183.
29. Ziegler-Heitbrock, H. W. 1996. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunol Today* 17:424-428.

BIOTA FÚNGICA AMBIENTAL EN UNIDADES DE INTERNACIÓN CRÍTICAS PEDIÁTRICAS

Fernández, Mariana Soledad, Giusiano, Gustavo Emilio
Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste.
Departamento de Micología

INTRODUCCIÓN

En la práctica médica tienen cada vez más importancia las enfermedades causadas por hongos oportunistas adquiridas en ambientes hospitalarios. Las estadísticas demuestran que el número de muertes derivadas de infecciones por hongos contraídas en las salas de cuidados especiales alcanza hoy cifras récord¹. La proporción de pacientes sin neutropenia o inmunosupresión severa que presentan riesgo de contraer una infección fúngica invasiva es más alta de lo que se piensa².

Entre los agentes más destacados se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Stachybotrys*, *Curvularia* y *Scedosporium*. La mayor gravedad se presenta en los lugares de alto riesgo, como guarderías, residencias de ancianos, quirófanos y unidades de terapia intensiva³.

En los ambientes internos la proliferación de los contaminantes biológicos (hongos sobretodo) se da en las zonas húmedas, es decir, humedad de las paredes, agua estancada procedente de aparatos de refrigeración, humidificadores, floreros, filtros de aire, alfombras, cortinas de tela, macetas con plantas o pinturas porosas. Por lo tanto, la vigilancia epidemiológica en los hospitales es necesaria para evitar enfermedades producidas por hongos, tales como sinusitis fúngica, colonización de heridas o infecciones invasoras que se caracterizan por tener alta morbilidad^{4,5,6}. Para ello, es imprescindible conocer la calidad del aire confinado, realizando un recuento selectivo de levaduras y de mohos, como el más elemental mecanismo de prevención de enfermedades^{3,7,8}.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el grado de contaminación fúngica de la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) y de la Unidad de Quemados (UQ) del Hospital Pediátrico "Juan Pablo II" de la ciudad de Corrientes, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras se tomaron durante dos años en UTI y en UQ del Hospital Pediátrico "Juan Pablo II" de la ciudad de Corrientes, Argentina.

La recolección de los propágulos fúngicos se realizó cada 15 días, durante la primavera y el otoño, con el colector de aire Surface Air Sampler, P.B.I. Intenational super 100 (SAS). Con

el fin de comparar tanto la carga como la diversidad fúngica, se muestrearon paralelamente las salas y el ambiente inmediato a la puerta principal de cada una de ellas, que se consideró como blanco (BI). En todos los muestreos se siguió un diseño diagonal tomando 3 o 5 puntos de acuerdo a la superficie de los ambientes⁹.

Las muestras se tomaron al mediodía, después de la limpieza habitual de las salas. El SAS se colocó a 1,50 metros del suelo y el flujo de aire fue de 200 litros. Como medio de impacto se utilizó agar papa dextrosa con cloranfenicol 250mg/l (PDA/ATB), en placas de Petri de 9mm⁹.

Por otro lado, mediante el método del hisopo²³, se tomaron muestras de superficie (Sup) de las mesadas y del equipamiento de control médico presente en las salas. En el mismo momento del muestreo se realizó la siembra por estrías en placas de Petri de 9 mm conteniendo PDA/ATB.

La toma de muestra se realizó simultáneamente por los dos métodos.

Las placas obtenidas de ambos tipos de muestreo se incubaron a 28°C durante 72 hs; al cabo de la cuales se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonia por placa (UFC/placa) y se extrapoló a unidades formadoras de colonia por metro cúbico (UFC/m³) según las instrucciones del fabricante¹⁰. Cada taxa se contabilizó una sola vez en cada muestra, no importando si se repetía en la misma placa o aparecía en las otras.

Las cepas de mohos se identificaron por su macro y micromorfología. Las colonias que no desarrollaron órganos de fructificación en los subcultivos, tras 20 días de incubación a 28°C, fueron agrupadas como micelio sin fructificación.

Para la clasificación taxonómica de los hongos se utilizaron las claves taxonómicas^{11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24}.

La correlación estadística de variables discretas se estudió mediante el test de Student y la técnica de Chi cuadrado, considerándose un nivel de significancia de $p < 0,05$. Se trabajó con el programa Epi info versión 6.

RESULTADOS

En UTI, en cada año, se tomaron seis muestras en otoño y seis muestras en primavera pero, a) el quinto muestreo de otoño del primer año fue después de la fumigación de la sala, por lo

tanto crecieron pocas colonias y b) en el tercer muestreo de primavera del primer año el desarrollo de *Chrysonilia sitophila* en todas las placas impidió el recuento e identificación de otros hongos pues las placas fueron eliminadas para evitar la contaminación del laboratorio.

En UQ se realizaron seis muestreos en otoño y sólo tres en primavera durante el primer año debido a la clausura de las salas en el mes de noviembre por disposiciones internas del Hospital. Además, en el segundo y quinto muestreo de otoño se dificultó el recuento e identificación de las colonias debido al desarrollo de *Chrysonilia sitophila*. En el segundo año se pudieron tomar seis muestras en otoño y seis en primavera.

En total se aislaron 1275 colonias de hongos de las que fueron identificados 29 géneros y 71 especies, considerando aire y superficies.

Los géneros de hongos filamentosos más frecuentes en el aire y en las superficies en ambas unidades y en ambos años fueron los integrantes de los géneros: *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, seguidos por *Acremonium*, *Fusarium*, *Curvularia* y *Chrysonilia*. Algunos de sus integrantes son considerados como patógenos oportunistas y productores de toxinas como: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Acremonium*

strictum complex, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum* y *Stachybotrys atra* los cuales también fueron aislados en los muestreos.

En UTI, considerando ambos años, se aisló un mayor número de taxa [690] que en UQ [585], siendo más notoria ésta diferencia en primavera y encontrándose una diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la **Tabla I** se observa el recuento promedio de UFC/m³ durante los dos años de muestreo, en otoño y primavera, para cada unidad y el BI correspondiente a cada una. No se observó diferencia significativa entre los recuentos de los ambientes, entre los de las estaciones ni entre ambos años.

Tabla I. Recuento promedio de UFC/m³ durante los dos años de muestreo según estación y unidad.

OTOÑO (UFC/m ³)			
BI UTI	UTI	BI UQ	UQ
568	557	474	371
PRIMAVERA (UFC/m ³)			
BI UTI	UTI	BI UQ	UQ
420	336	215	202

El recuento promedio durante ambos años de las (UFC/placa) en las Superficies de UQ resultó significativamente mayor ($p < 0.05$) en otoño **70,8 (UFC/placa)** en comparación con el recuento promedio obtenido en primavera **16,5 (UFC/placa)**.

En UTI el recuento promedio en las Superficies durante ambos años fue de **30,8 (UFC/placa)** durante el otoño y de **47 (UFC/placa)** durante la primavera, sin observarse diferencia significativa.

En UTI se obtuvo en ambos años un mayor aislamiento de levaduras con respecto a lo que se obtuvo en UQ, considerando el aire y las superficies.

En total se aislaron 140 levaduras considerando aire interno, blanco y superficies de ambas unidades pero sólo se pudieron identificar 40 (28,57%) debido a la dificultad de algunas cepas para desarrollar *in vitro* y a que en muchos casos fue imposible separar las levaduras de los mohos, por lo que las pruebas bioquímicas, que necesitan cepas puras, no pudieron aplicarse a la identificación de aquellas. Entre las levaduras se aislaron especies de *Candida* y de *Cryptococcus* reconocidos como agentes oportunistas.

A partir de estos resultados podemos ver que en UQ se ha aislado mayor número de hongos filamentosos y de levaduras con respecto al blanco en ambos años, lo mismo puede verse en UTI. No encontrándose una diferencia significativa en ambos casos.

DISCUSIÓN

Si bien la interpretación de los resultados en los muestreos de aire es problemática por una multiplicidad de factores, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la existencia de mohos y levaduras en mayor cantidad que la esperada en tipo de salas muestreadas. En el trabajo de Cerminara se establece que la cantidad de UFC/m³ no debe sobrepasar las 70 UFC/m³ en salas de alto riesgo como en los quirófanos en general ni las 400 en las salas de internación común²⁵. Los resultados presentados son el promedio de lo hallado y teniendo en cuenta los inconvenientes detallados en resultados, es fácil deducir que la contaminación es muy importante. Esa fue la razón por la cual se cerró la UQ hasta que se instalaran acondicionadores de aire con filtros adecuados.

El hecho de que se hayan detectado más hongos en las salas de la UQ y de UTI que en el blanco de ambas, puede atribuirse 1) a que en UQ no funcionaba correctamente el acondicionador de aire, 2) a que en UTI la puerta de acceso a la sala estaba siempre abierta y 3) a la falta de mantenimiento de los filtros de aire en las dos unidades. El mayor número de UFC/m³ encontrado en UTI con respecto a la UQ, posiblemente se deba a que en la última se tomaron menos muestras.

Se eligió realizar el trabajo en las estaciones de otoño y primavera, porque en esta región son los períodos más lluviosos y menos lluviosos respectivamente. Si bien la biota aérea de las salas hospitalarias debe estar controlada y ser independiente de la exterior, en otoño se obtuvo mayor carga fúngica que en primavera, hecho que concuerda con lo registrado para el aire exterior de las ciudades de Corrientes, de Resistencia y de Córdoba (Argentina) donde la mayor densidad se produjo en los meses más fríos^{26,27}. Recordando que las grandes diferencias metodológicas y geográficas registradas en la literatura aeromicológica dificultan la comparación de resultados.

Para obtener una información fidedigna se recomienda la utilización de métodos de muestreo combinados ya que no es posible recoger y evaluar todos los componentes de la biota fúngica utilizando un único método de muestreo^{1,9,10}. En ambas unidades la aplicación del método del hisopo y del muestreador de aire se complementaron y permitieron la descripción de una diversidad mayor.

Tanto en el ambiente interno y externo de UQ como en UTI, en ambos años, el hongo aislado con mayor frecuencia fue *Cladosporium*, seguido

de *Penicillium* y *Aspergillus*. En menor frecuencia se aisló *Acremonium*, *Fusarium*, *Curvularia* y *Chrysonilia*. Lo mismo puede observarse en las superficies muestreadas de dichas unidades. Resultados similares fueron obtenidos por Barros y col.²⁸; Centeno y col.²⁹ en Brasil y Venezuela respectivamente.

Diversas especies de *Aspergillus* entre las que se encuentran *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. nidulans*, son causantes de alergias e infecciones profundas del tracto respiratorio, llamadas aspergilosis broncopulmonar, en pacientes con alguna inmunodepresión³. Así mismo, *Penicillium*, ha sido reportado como agente de penicilosis broncopulmonar, de infecciones del oído externo y de hialohifomicosis¹⁴.

Desde la perspectiva de la salud pública, el aislamiento de *Stachybotrys chartarum* es un indicador de presencia de focos de humedad en las paredes o en las superficies. Las consecuencias de la inhalación de los propágulos de este hongo, están relacionadas con

la presencia de la micotoxina sobre sus conidias. Se han informado casos de enfermedad pulmonar infantil graves asociadas a *Stachybotrys*⁴.

Entre las levaduras blancas las especies del género *Cándida* son destacables, porque si bien forman parte de la flora normal del humano en condiciones de debilidad inmunológica del individuo se comportan como patógenos oportunistas. En especial *Candida albicans*, la cual puede entrar directamente a la circulación a través de catéteres intravenosos, líneas de alimentación parenteral o durante cirugías. Esta especie es el tercer agente más frecuentemente aislado de cultivos de sangre en pacientes hospitalizados y además es causante de candidiasis e infecciones sistémicas³⁰.

Teniendo en cuenta que las áreas hospitalarias estudiadas son ambientes que deben permanecer libres de cualquier contaminación microbiana, y que los resultados obtenidos demuestran la existencia hongos que pueden ocasionar infecciones nosocomiales, se hace necesario planificar e implementar medidas de control higiénico, como la desinfección adecuada de las áreas críticas, la instalación de sistemas de aires acondicionados, con sus respectivos filtros y su frecuente mantenimiento, y evaluar periódicamente el grado de contaminación en estos ambientes, con la finalidad de reducir las causas de contaminación fúngica y de esta forma prevenir posibles infecciones fúngicas nosocomiales.

ABSTRACT

In the last decades the role of the air in the microorganisms' transmission has been demonstrated not only to susceptible patients but to the professional health workers. The aim of this work was to study the airborne fungi of Intensive Care Unit and Burn Unit of Paediatric Hospital Juan Pablo II of Corrientes city (Argentina).

The sampling was performed during two years by sprinkling method and volumetric equipment (System Air Sampler), in autumn and springtime, every 15 days, at noon, after the usual unit cleaning time.

The number of Colony Forming Units per cubic meter (CFU/m³) found considerably exceeded the established parameters. The number of taxa detected in the Intensive Care Unit in both years (690) was higher than the one found in the Burn Unit (585). This difference was more evident in springtime. In both units the most frequent genera were: *Cladosporium*, *Penicillium* and *Aspergillus*, followed by *Acremonium*, *Fusarium*, *Curvularia* and *Chrysomya*. Among yeasts *Candida* and *Cryptococcus* species, known as opportunistic agents, were isolated. Pathogenic and toxicogenic species considered unacceptable in indoor environments, such as *Aspergillus fumigatus* and *Stachybotrys atra*, were detected.

Several fungi isolated in this work are of public health interest due to their capability of producing opportunistic infections, allergies and mycotoxicosis. Due to this work environmental control measures were intensified in The Intensive Care and Burn Units of this Hospital.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zumbado H. Epidemiología y control microbiológico de infecciones. En: Isenberg H.D., editor. Manual de Procedimientos en Microbiología Clínica. <http://www.cariari.vcr.ac.cr/gacetapc/Epidem-Control.html>, 2004.
2. Hao Z, Ao J, Hao F, Yang R, Zhu H and Zhang. Environment surveillance of filamentous fungi in two tertiary care hospitals in China Jie. Chinese Medical Journal 2011; 124:1970-1975.
3. Flannigan, B. & Miller, D.. Health implications of fungi in indoor environments – an overview. En: Samson RA; Flannigan B; Flannigan ME; Verhoeff AP, Adan OCG, Hoekstra ES, editores. Health implications of fungi in indoor environments. Air quality monographs, 1994; 2: 3-11.
4. Miller, D; Rand, T; Jarvis, B. *Stachybotrys chartarum*: cause of human disease or media darling?. Medical Mycology, 2003; 41: 271 – 291.

5. Spieksma, F; Kramps, J; Van Der Linden, A; Nikkels, B; Plomp, A; Koerten, H; Dijkman, J. Evidence of grass-pollen. *Clinical and Experimental Allergy*, 1990; 20:273-80.
6. Streifel, A. Hospital Epidemiology and Infection Control. En: Glen Mayhall Editor. *Design and Maintenance of Hospital Ventilation Systems and the Prevention of Airborne Nosocomial Infections*. USA., 1996; p. 955.
7. Alfano, V.; Visciano, A.; Liguori, G. Aspetti pratici del monitoraggio microbiologico ambientale. *Biologia Clinica*, 2007; 2:30-34.
8. UNICHIM. Manuale N. 203. Rischio biologico in ambienti "indoor". Inquadramento della problematica e strategia di controllo e prevenzione. Associazione per l'Unificazione nel Settore dell'industria Chimica. Federata all'UNI. Milano, 2009.
9. Rojas TI, Martínez E, Aira MJ y Almaguer M. (2008). Aeromicrobiota de ambientes internos: Comparación de métodos de muestreo. *Boletín Micológico*. Vol 23. 67-73.
10. Martí Solé, M NTP 299: Método para el recuento de bacterias y hongos en aire. http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_299.htm. 1993.
11. Gams, W. (1971). *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*. G Fischer Verlag. Stuttgart.
12. Onions, A.; Allsopp, D. & Eggins, H. (1981). *Smiths's introduction to industrial Micrology*, 7ª ed. John Wiley & Sons. New York.
13. Von-Arx, J.A. (1981). *The genera of fungi sporulating in pure culture*. 3ª ed. Edit J. Crame. Vaduz.
14. Hoog, G. & Guarro, J. (2000). *Atlas of Clinical Fungi*, 2ª ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn and Delft.
15. Samson, R.; Hoekstra, E.; Frisvad, J.C. & Filtenborg, O. (2000). *Introduction to food and airborne fungi*. Utricht. Centraalbureau voor Schimmelcultures. The Netherlands.
16. Rifai, M.A. (1969). A Revision of the Genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* N° 116
17. Bissett, J. (1991). A Revision of the Genus *Trichoderma*. H. Infrageneric classification, *Can. J. Bot.* 69:2357-2372.
18. Piontelli, E. & Toro, M.A. (1994). *Manual de identificación para microhongos comunes en alimentos*. Universidad de Valparaíso. Escuela de medicina. Cátedra de Micología. Valparaíso.
19. Sivanesan, A. (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological papers*, N° 158. C.A.B. International Mycological Institute.
20. Pitt, J.I. (1986). *A laboratory guide to common Penicillium species*, Reprinted. Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of food Research.
21. Ellis, M.B. & Ellis, J.P. (1987). *Microfungi on land plants. An identification handbook*. Croom Helm. Australia.
22. Klich, M.A. & Pitt, J.I. (1988). *A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs*. Reprinted. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of food Processing. Australia.

23. Carmichael, J.; Kendrick, B.; Connors, I.; Sigler, L. (1980). *General of Hyphomycetes*. The University of Alberta Press. Canada.
24. De Hoog & Hermanides-Nijhof (1977). The black yeasts and allied hyphomycetes.
25. Cerminara R.H. (2000) Control del aire en los Hospitales. www.enfermeria21.com/listametas.doc
26. Esquivel P, Mangiaterra M, Giusiano G, Sosa MA. (2003); Microhongos anemófilos en dos ciudades del nordeste argentino. *Boletín Micológico Chile*. 18:21-28. ISSN 0716 –114X
27. Quiroga de Pascual RL, Nobile R. (1985) Incidencia de hongos ambientales durante un año en la ciudad de Córdoba. *Rev. Arg. de Micol* 8(1): 16-22.
28. De Barros MG, Cavalcanti M.A., Massa Lima D.M. e Fernández. M.J.S. (1990) Fungos isolados do ar e do piso de ambientes fechados do Hospital Escola da Universidad Federal de Pernambuco, Recife, Brasil-I. *Boletín Micológico Chile*.; 5: 57-67.
29. Centeno S.; Machado S. (2004). Evaluación de la micoflora aérea en las áreas críticas del Hospital Principal de Cumaná, estado Sucre, Venezuela. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela. *Investigación Clínica*. Vol. 45 N° 2. Maracaibo, junio.
30. Cantón E, Viudes A, Pemán J. (2001). Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev Iberoam Micol*; 18:51-51.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ESPECÍFICA EN EL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) Y DESARROLLO DE ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Romina J Fernández-Brando, Leticia V. Bentancor, María Pilar Mejías,
Gabriel Cabrera.

División Inmunología, Instituto de Medicina Experimental (IMEX) (CONICET).

INTRODUCCIÓN

La forma típica del síndrome urémico hemolítico (SUH) se desarrolla secundariamente a la infección con cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* (EHEC) productoras de toxina Shiga (Stx) (STEC), es de carácter infeccioso y epidémico y se presenta principalmente en niños entre 0 y 5 años. Argentina presenta la mayor incidencia del mundo, siendo la principal causa de falla renal aguda en la infancia y la segunda de trasplante renal en la adolescencia. Si bien la mortalidad por SUH se ha reducido al 3% debido a las terapias de sostén, especialmente la diálisis peritoneal, alrededor del 30% de los pacientes recuperados presenta secuelas neurológicas ó falla renal crónica (Tar, 1995; Obrig, 1997; Proulx, 2001; Karmali, 2004). En la actualidad no existen tratamientos específicos ni preventivos que posibiliten controlar el nivel de daño renal. La obtención de un esquema preventivo con el fin de bloquear la toxina durante las primeras fases de la enfermedad es un punto importante y teóricamente factible en esta patología, ya que existe una “ventana” de 3 a 7 días desde la diarrea sanguinolenta (primer signo presuntivo de SUH) hasta el desarrollo de la forma completa del SUH, durante la cual es posible plantear la aplicación de este tipo de tratamiento.

El SUH es desarrollado por aproximadamente el 10% de los niños que cursan una infección gastrointestinal por EHEC/STEC. Las EHEC/STEC colonizan el intestino y secretan la Stx que, luego de atravesar la barrera intestinal, llega a la circulación sistémica alcanzando al órgano blanco, en donde interactúa con su receptor específico (Gb3) para internalizarse e inhibir la síntesis proteica. En el riñón, la toxina causa destrucción de las células epiteliales tubulares y del endotelio glomerular (Proulx F. et al, 2001). Existen dos tipos de Stx antigénicamente diferentes: Stx1 y Stx2 con sus variantes. Sin embargo, la Stx2 es clínica y epidemiológicamente más relevante, ya que es la más

frecuentemente asociada a casos de SUH (*Boerlin P et al, 1999*). Su estructura incluye dos subunidades, la A (subA) enzimáticamente activa y antigénicamente conservada entre las distintas variantes de toxinas, y una subunidad B (subB) pentamérica de unión al receptor.

Datos clínicos, epidemiológicos y experimentales sugieren que la existencia de inmunidad activa a través de la presencia de anticuerpos anti-Stx disminuye el riesgo de SUH. Desde el punto de vista clínico, la excepcionalmente rara ocurrencia de un segundo episodio de SUH post-entérico es una evidencia indirecta de una eficiente respuesta inmunológica activa y con capacidad protectora contra la Stx (*Exeni R, 2001*). Estudios epidemiológicos realizados en Canadá y Alemania (*Ludwig K et al, 2002*) hallaron que cerca del 60% de la población adulta urbana presentó anticuerpos anti-Stx. Estos valores tan altos podrían dar cuenta de la ausencia de enfermedad en el adulto (*Karmali MA et al, 2003*). En nuestro país, a pesar de la excepcionalmente alta incidencia de SUH, no hay estudios sobre el porcentaje de individuos sanos que presentan anticuerpos anti-Stx. En un único trabajo se describió que el 42% de los parientes directos de los pacientes con SUH mostraban anticuerpos anti-Stx1 neutralizantes (*López EL et al, 1991*). No solamente la presencia sino también la persistencia y calidad de dicha respuesta inmune específica serían de vital importancia ante una nueva exposición a la bacteria. En la actualidad se carece de estudios que evalúen la especificidad, la capacidad neutralizante y la durabilidad de la respuesta de anticuerpos de pacientes con SUH, tanto en el momento agudo como luego de la recuperación a mediano y largo plazo. Por todo esto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta humoral específica anti-Stx2 de pacientes con SUH, en el momento agudo y a distintos tiempos luego de la recuperación, lo cual nos permitiría conocer la respuesta inmune que se desencadena naturalmente en los individuos luego de la primoinfección, y evaluar la existencia de anticuerpos anti-Stx2 en individuos que nunca presentaron una infección con STEC sintomática (controles), para estimar su prevalencia en la población argentina normal.

RESULTADOS

Western blot para la detección de anticuerpos contra las sub A y/o B de la Stx2

La Stx2 purificada fue separada en un gel SDS-PAGE y transferida en membranas de PVDF. Dos bandas correspondientes al peso molecular de las

subunidades A y B fueron identificadas con un anticuerpo policlonal de ratón anti-Stx2 (Figura 1). Las muestras de plasma que fueron positivas, reconocieron la subA sola, la subB sola o ambas subunidades. A pesar de que la intensidad de la reactividad fue variable, las señales más fuertes fueron obtenidas con los plasmas provenientes de los grupos SUH o SUHrec.

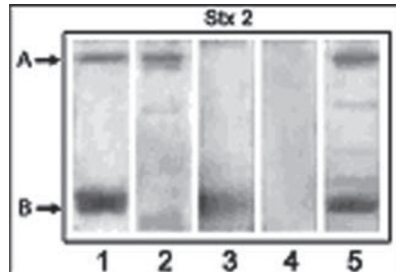


Fig.1. Anticuerpos contra la Stx2. Bandas representativas de plasmas de niños con SUH o controles son mostradas. Línea 1 muestra un plasma policlonal de ratón reactivo contra las sub A y B; plasmas humanos positivos mostraron reactividad contra la sub A sola (línea 2), la sub B sola (línea 3), o ambas subunidades (línea 5). Las muestras que mostraron una ausencia completa de bandas fueron consideradas negativas (línea 4).

Frecuencia de anticuerpos contra la Stx2

La Figura 2 muestra la frecuencia de plasmas reactivos contra la subA y/o la subB o ninguna de las subunidades de la Stx2 en los distintos grupos experimentales. La frecuencia de plasmas reactivos con al menos una subunidad de la Stx2 en el grupo Ctról (67%) fue significativamente menor que la observada en el grupo SUH (86%) y SUHrec (82%) ($X^2 p < 0.05$). Los pacientes SUH desarrollaron anticuerpos contra ambas subunidades de la Stx2 con más frecuencia que el grupo Ctról (SUH= 56%, Ctról=33%, $p < 0.01$ Fisher). Sin embargo, esta diferencia fue perdida durante el periodo de recuperación (SUHrec= 39%, $p = 0.39$ Fisher). Considerando las muestras que reaccionaron con la subA sola o junto con la subB observamos que el grupo SUH presentó una frecuencia significativamente mayor que el grupo Ctról (SUH= 70%, Ctról= 47%, $p < 0.01$, Fisher). Este incremento en la frecuencia de anticuerpos contra la subA se mantuvo en el grupo SUHrec (66%, $p < 0.05$ vs Ctról, Fisher). El grupo SUH también mostró una frecuencia de anticuerpos contra la subB significativamente mayor que el grupo

Ctrol (SUH = 72%, Ctrol= 53%, $p < 0.05$, Fisher), y esta diferencia fue perdida en el grupo SUHrec (53%).

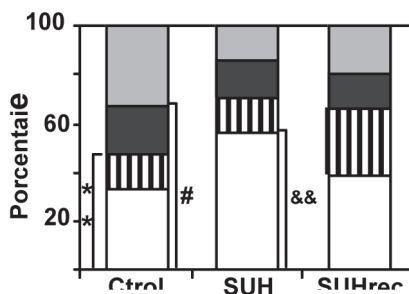


Fig.2. Frecuencia de anticuerpos contra la Stx2. Cada barra representa las muestras con las reactividades indicadas.

$p < 0.05$ vs HUS and HUSrec, X^2 ; * $p < 0.05$ vs HUS and HUSrec, ** $p < 0.01$ vs NHC, Fisher.

□ A/B ▨ A ■ B ▒ No reactivo

Anticuerpos contra la subB de la Stx2 medidos por ELISA

Los valores de absorbancia a 492 nm para cada muestra fueron clasificados de acuerdo al resultado obtenido para la subB en el WB en positivo o negativo, dentro de los respectivos grupos clínicos (Figura 3A). A pesar de que los resultados que fueron positivos mediante la técnica de WB mostraron un amplio rango de DO_{492} mediante la técnica de ELISA en los distintos grupos clínicos, la mediana de la absorbancia de las muestras positivas para el grupo SUH fue mayor que para el grupo Ctrol (SUH= 0.51, $n = 35$; Ctrol= 0.40 $n = 23$; $p < 0.01$, Wilcoxon). Además, un 89.7% de los pacientes del grupo SUH arrojó un resultado positivo mediante las dos técnicas, mientras que solamente un 8,3% fue positivo mediante la técnica de ELISA pero negativo mediante el WB, confirmando la robustez y especificidad, respectivamente, de la evaluación de las muestras por ambas técnicas. Por otro lado, un 63% de los pacientes del grupo SUHrec y un 65,7% del grupo Ctrol fueron reactivos contra la subB de la Stx2 por WB y ELISA. Finalmente, la Fig.3B muestra que el grupo SUH tuvo el mayor porcentaje de muestras positivas por los dos métodos ($p < 0.0005$ vs Ctrol y SUHrec, X^2), sugiriendo que la combinación de ambas técnicas aporta fuerza al resultado.

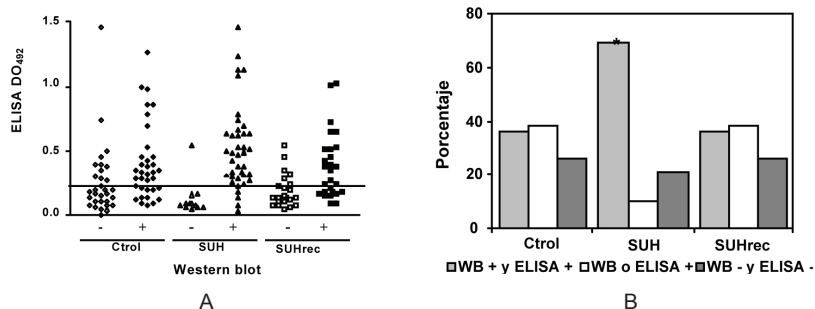


Figura 3. Anticuerpos contra la subunidad B de la Stx2 medidos por ELISA. A) Valores de absorbancia por ELISA detectando IgG anti-Stx2B en plasma de los niños de los distintos grupos, segregados de acuerdo al resultado (positivo o negativo) obtenido por WB para la subunidad B. La línea horizontal representa el valor de corte $DO_{492}=0.226$. B) Relación entre los resultados de WB y ELISA para la detección de anticuerpos contra la subunidad B de la Stx2. Las barras representan la frecuencia de muestras positivas por los dos métodos (gris claro), al menos un método (blanco) o ningún método (gris oscuro).

Cinética y duración de la respuesta de anticuerpos contra la subB en pacientes SUH

Ya que el grupo SUH mostró la mayor frecuencia de muestras positivas para la subB por WB (Fig.2) y mayores títulos de ELISA que el grupo SUHrec (Fig.3A y B), quisimos evaluar los títulos del ELISA de los niños que presentaron un episodio de SUH a lo largo del tiempo durante la recuperación (Fig.4). En la Fig.4 se observa que los valores de absorbancia del ELISA fueron mayores durante los primeros años luego de la enfermedad, siguiendo una lenta disminución con el tiempo. Es importante resaltar que pacientes que habían sufrido el episodio agudo de SUH hacía más de 10 años continuaban presentando anticuerpos contra la subA y/o B.

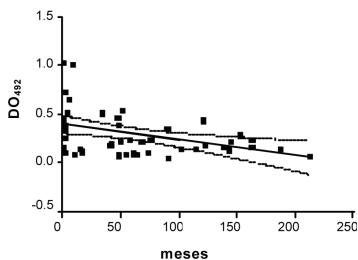


Figura 3. Anticuerpos contra la subunidad B de la Stx2 medidos por ELISA. A) Valores de absorbancia por ELISA detectando IgG anti-Stx2B en plasma de los niños de los distintos grupos, segregados de acuerdo al resultado (positivo o negativo) obtenido por WB para la subunidad B. La línea horizontal representa el valor de corte $DO_{492}=0.226$. B) Relación entre los resultados de WB y ELISA para la detección de anticuerpos contra la subunidad B de la Stx2. Las barras representan la frecuencia de muestras positivas por los dos métodos (gris claro), al menos un método (blanco) o ningún método (gris oscuro).

CONCLUSIONES

Nuestro trabajo indica que las técnicas de WB y ELISA pueden ser usadas en Argentina para la detección de anticuerpos anti-Stx2 en niños sanos y en pacientes que presentaron un episodio de SUH. Ya que ambos métodos permiten la detección de anticuerpos dirigidos contra distintos epítopes de la Stx2 (la subB sola o al toxina entera, la proteína nativa o desnaturalizada) probablemente el espectro de detección de anticuerpos sea mayor. Es interesante notar que la asociación entre un resultado positivo obtenido por las técnicas de WB y ELISA fue mas fuerte en el grupo SUH que en los grupos Ctról o SUHrec, probablemente como consecuencia de un mayor título de anticuerpos en el plasma del grupo SUH. Además, la evaluación simultánea por los dos métodos nos permitió diferenciar los niños con SUH agudo de los niños sanos (Ctról) con una gran especificidad y precisión, permitiendo confirmar la etiología del SUH cuando no se obtienen aislamientos bacterianos de STEC o Stx2 libre en materia fecal. De esta forma, la evaluación serológica por las técnicas de WB y ELISA de casos esporádicos de SUH constituye una herramienta diagnóstica.

Una frecuencia muy similar de anticuerpos contra la Stx2 en los grupos SUH y SUHrec fue encontrada (86 y 82% respectivamente), aún cuando habían pasado varios años desde el episodio agudo. En comparación, solamente el 67% de los pacientes del grupo Ctról presentó anticuerpos anti-Stx2. A pesar de que esta frecuencia fue significativamente menor comparada al grupo SUH, fue significativamente mayor que la frecuencia reportada en niños sanos de otros países como Alemania (10%) (*Ludwig K, et al. 2001*) o Canadá (46%) (*Karmali MA, et al. 2003*). Este resultado podría ser atribuido a la alta circulación de cepas productoras de Stx2 en Argentina, y/o asociado al comportamiento endémico del SUH en nuestro país. Además, la existencia de una población no sintomática de adultos que portan cepas patógenas podría contribuir a este comportamiento a través de la transmisión persona-persona. Efectivamente, adultos o niños con aislamientos de STEC de materia fecal son detectados frecuentemente cuando un niño presenta diarrea sanguinolenta asociada a STEC o SUH.

En relación a la especificidad de anticuerpos anti-Stx2, observamos que los pacientes de SUH (SUH agudo + SUHrec) mostraron una mayor frecuencia de anticuerpos anti-subA de la Stx2 comparado con los controles. Además, un importante hallazgo de este trabajo es que los pacientes de SUH tienen una respuesta inmune humoral duradera, particularmente contra la

subA. Este hecho tiene varias implicaciones teóricas y prácticas. En primer lugar, esos resultados van en contra de la hipótesis de que la Stx2 es citotóxica para los linfocitos B, previniendo la inducción de una respuesta de anticuerpos contra la Stx2, que ya había sido cuestionada por *Barrett et al (1991)*. Por otro lado, debido a que STEC/Stx2 es endémica en Argentina, es posible que una infección gastrointestinal asintomática o autolimitada con cepas patógenas sea suficiente para estimular una respuesta de anticuerpos detectable contra la subA de la Stx2.

El anticuerpo secundario usado en este estudio reconoce las cadenas pesada y liviana de la IgG, por lo tanto el WB podría detectar no solamente IgG sino también potencialmente IgM e IgA. Sin embargo, es probable que entre los pacientes del grupo SUH los anticuerpos detectados sean IgM e IgA, y en la etapa de recuperación o seguimiento y en el grupo Ctrol sea IgG.

La persistencia de anticuerpos anti-Stx2 fue investigada en 49 muestras de pacientes a distintos tiempos durante su recuperación o seguimiento (SUHrec), y dicha respuesta fue duradera. Este hallazgo difiere con la corta persistencia de anticuerpos anti-Stx observada en Alemania. Ludwig *et al* encontraron que los niveles de anticuerpos del 50% de los pacientes con SUH disminuye debajo del valor de corte a los 3 meses de la aparición de la diarrea. Sin embargo, no sabemos si la mayor duración de la respuesta de anticuerpos en los pacientes argentinos se debe a una continua reestimulación o si está relacionada a diferencias metodológicas en los ensayos usados. De todas formas, la respuesta de anticuerpos contra la subB de la Stx2 tiende a disminuir más rápidamente que contra la subA. Evidencia reciente sugiere que los anticuerpos específicos anti-subA de la Stx2 podrían ser importantes para la protección (*Bitzan M, 2009*). En efecto, anticuerpos monoclonales anti-subA de la Stx2 han probado ser tanto o más protectores que aquellos dirigidos contra la subB (*Smith MJ et al, 2006; Sheoran AS et al, 2003*). A pesar de que los mecanismos involucrados son aún un tema de discusión, ha sido reportado recientemente que los anticuerpos anti-subA de la Stx2 interfieren con el transporte retrógrado de la toxina, y podrían interactuar con la Stx2 cuando está unida a los receptores de membrana (*Krautz-Peterson G et al, 2008*). Además, los anticuerpos anti-subA de la Stx2, a diferencia de los anti-subB, tienen un amplio espectro de actividad que incluye otras variantes de la Stx2, tales como la Stx2c (*Lindgren SW, 1994; Sheoran AS, 2003*).

En conclusión, la información proporcionada por este trabajo podría aportar datos inmunológicos como base de futuros esquemas de vacunación contra la Stx y estimular a los laboratorios del Sistema Nacional de Vigilancia

a estandarizar ambas técnicas para la evaluación poblacional de áreas con distinta incidencia de SUH.

ABSTRACT

Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) infection is associated with a broad spectrum of clinical manifestations that include diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic uremic syndrome (HUS). Systemic Stx toxemia is considered to be central to the genesis of HUS. Distinct methods have been used to evaluate anti-Stx response for immunodiagnostic or epidemiological analysis of HUS cases. The developments of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot (WB) assay to detect the presence of specific antibodies to Stx has introduced important advantages for serodiagnosis of HUS. However, application of these methods for seroepidemiological studies in Argentina has been limited. We developed a standard ELISA to detect antibodies against the B subunit of Stx2, and a WB to evaluate antibodies against both subunits of Stx2 and Stx1. Using the combination of both methods we detected 67% of plasma from normal healthy children (Ctrol) reactive for Stx2. These results are in agreement with the broad circulation of Stx2-expressing STEC in Argentina and the endemic behavior of HUS. Moreover, the simultaneous evaluation by the two methods allowed us to differentiate acute HUS patients from NHC with a great specificity and accuracy, in order to confirm the HUS etiology when pathogenic bacteria were not isolated from stools.

CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS DIRIGIDOS AL FVIII EN HEMOFILIA A SEVERA. DETERMINACIÓN DE SU IMPORTANCIA EN EL MANEJO CLÍNICO DE LOS PACIENTES

Nora Galassi¹, M Belén Irigoyen¹, M Felippo¹, M Candela^{2,3}, L Primiani², R Pérez Bianco^{2,3}, M M de E de Bracco¹

¹IMEX-CONICET, ²Fundación Argentina de Hemofilia, ³IIHEMA-Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCION

Los pacientes con Hemofilia A Severa (HAS) que reciben tratamiento de reemplazo con factores de la coagulación pueden desarrollar (20-30%) inhibidores (Ac-In) que complican la terapia sustitutiva. Se han encontrado también, tanto en pacientes como en individuos normales, anticuerpos específicos no neutralizantes (Ac-NIn) pero que pueden acelerar la depuración del FVIII exógeno^{1,2}.

El método de rutina que se emplea para evaluar los inhibidores es la prueba funcional de Bethesda con la modificación de Nijmegen³. Pero esta prueba no detecta los Ac-NIn ni es útil para caracterizar los anticuerpos específicos.

La única estrategia que se emplea para erradicar los anticuerpos es un tratamiento de inducción de inmunotolerancia (TIT) que consiste en la infusión frecuente de altas dosis de FVIII. El 80% de los pacientes logra la erradicación completa después de 1 a 3 años de tratamiento⁴. El resto de los pacientes solo alcanza un éxito parcial y en una minoría, el tratamiento fracasa.

La respuesta inmune al FVIII es policlonal con prevalencia de la clase IgG pero con una distribución de subclases diferente según el grupo poblacional de pacientes estudiado. Hay disparidad de datos pero todas las subclases de IgG pueden estar involucradas en distintas proporciones^{5,6,7,8}. La prevalencia de una u otra subclase determina que los anticuerpos dirigidos al FVIII tengan distinta funcionalidad⁹. La IgG4 es la de mayor prevalencia en pacientes con elevados títulos de inhibidores y en aquellos en los cuales fracasa el TIT¹⁰. La IgG3 es la menos representada. Si bien la respuesta es policlonal, se ha señalado que su heterogenicidad está restringida⁵. A diferencia de otras patologías, la IgG4, en el caso que nos ocupa, es considerada un anticuerpo patológico^{11,12}.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un inmunométodo que combina la citometría de flujo con microesferas para medir los anticuerpos dirigidos hacia el FVIII¹³. Esta técnica resultó útil para medir el nivel de IgG específica (Ac-In y Ac-NIn), requiere sólo 200 µl de plasma y/o suero, lo cual la hace especialmente adaptada a los pacientes pediátricos que son mayoría dentro de la población de pacientes que desarrollan el inhibidor.

Empleando un anticuerpo revelador dirigido a cada subclase de inmunoglobulina, también puede ser una metodología útil para determinar las subclases involucradas en la respuesta. No hay estudios realizados para caracterizar la respuesta inmune humoral de los pacientes con HAS de nuestro medio. El objetivo de este proyecto fue realizar un estudio transversal para establecer el grado de prevalencia de la IgG4 comparando la población de pacientes de alta y baja respuesta y determinar qué otras subclases de IgG intervienen en la respuesta inmune al FVIII. Por otro lado, se incluyó un estudio longitudinal en pacientes antes y durante el TIT para analizar si los cambios de subclase a lo largo del tratamiento pueden predecir el éxito del mismo.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes:

Se estudiaron 56 pacientes con HAS: 11 sin inhibidores neutralizantes (<0.5 UB/ml) de FVIII al momento de extracción de la muestra pero con historia de inhibidor, 45 con inhibidores activos (>0.5 UB/ml) y 6 pacientes antes y durante el tratamiento de inducción de inmunotolerancia dentro de un protocolo que emplea 100 ó 200 U/Kg de FVIII tres veces por semana durante 18 meses.

Todos los pacientes dieron su consentimiento informado de acuerdo a las normas del Comité de Ética institucional.

Procesamiento de las muestras:

La muestras de sangre entera anticoagulada fueron obtenidas antes de la infusión del FVIII. Los plasmas fueron separados por centrifugación a 900 rpm por 10 minutos seguido por una segunda centrifugación para eliminar plaquetas a 2500 rpm por 5 minutos. Finalmente, los plasmas fueron almacenados a -20°C hasta su empleo.

Análisis de las subclases:

La adsorción del FVIII a las microesferas, su verificación y la evaluación de los plasmas para obtener el nivel de anticuerpos anti-FVIII por citometría de flujo fue publicado por nosotros previamente¹³. Para el análisis de subclases, se siguió la misma metodología empleando la dilución de plasma o suero con la que se obtuvo el valor del Índice. Se reveló la reacción con los anticuerpos anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 o anti-IgG4 biotinilados (Sigma) y streptavidina PE-Cy5.5 (BD Pharmingen). La suma de las IFM obtenidas con las cuatro subclases se consideró como 100% y a partir de ella se calculó el porcentaje de contribución de cada subclase.

Unidades Bethesda (UB)

El título del inhibidor fue obtenido por la técnica de referencia³. El límite de detección fue <0.5 UB/ml

Análisis estadístico:

El coeficiente de correlación r de Spearman para datos no paramétricos fue calculado empleando el GraphPad Software. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Prevalencia de IgG total anti FVIII por CF

Los pacientes fueron agrupados en: Grupo I: 14 pacientes de baja respuesta (<5UB/ml, sin anamnesis) y Grupo II: 42 pacientes de alta respuesta (>5UB/ml, con respuesta anamnésica). De este total de 56 pacientes, 11 no tenían Ac-In al momento de la extracción. La Tabla 1 resume la prevalencia de los anticuerpos y la relación entre ambos métodos. El 100% de pacientes del Grupo II fueron positivos por CF a pesar de que en 5 de ellos no se detectaron inhibidores en el momento de la extracción. El Grupo I representó el más dificultoso de evaluar y en el cual se encontraron las mayores discrepancias.

Distribución de las subclases de IgG anti- FVIII

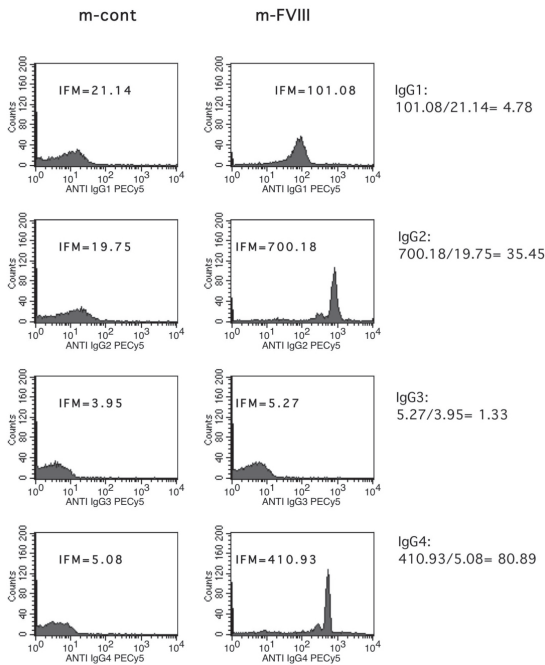
En la Figura 1 se muestra un ejemplo que explica el método empleado para la evaluación del porcentaje de contribución de cada subclase de IgG en la respuesta anti-FVIII de los pacientes con HAS. El análisis de las subcla-

Tabla 1: Prevalencia de anticuerpos anti-FVIII en pacientes con HAS. Grupo I: con historia de inhibidores de bajo título (<5 UB/ml) Grupo II: con altos títulos históricos (>5 UB/ml). Los UB/ml corresponden a los títulos de Ac-In presentes en los plasmas el día de la extracción

Pacientes	UB/ml	n*	CF** (positivos/total)
Grupo I	<0.5 (neg)	6	2/6
	0.5-1	8	5/8
Grupo II	<0.5 (neg)	5	5/5
	0.5-5	16	16/16
	6-8200	21	21/21

*: número de pacientes
** Citometría de Flujo

Figura 1: Evaluación de las subclases de IgG anti FVIII. Análisis citométrico de una muestra.

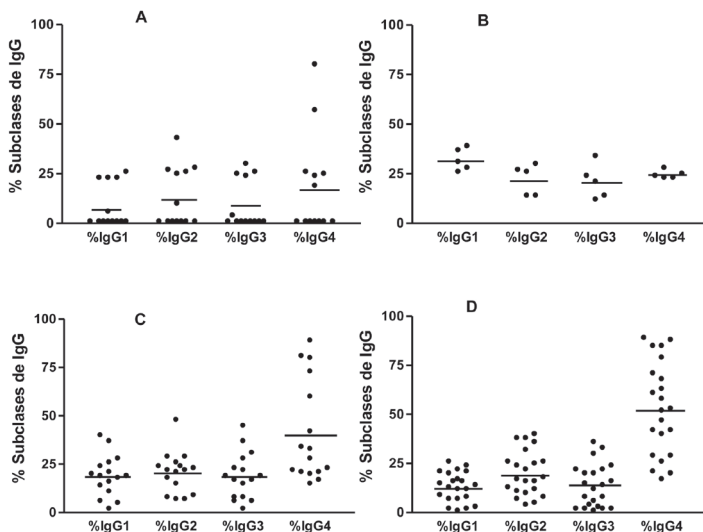


Los porcentajes de contribución de cada subclase se obtuvieron con el siguiente cálculo:
4.78 + 35.45 + 1.33 + 80.89 = 122.45.
Este valor se considera como el 100% a partir del cual se calculan los porcentajes para cada subclase, en el ejemplo: 3.9% para IgG1, 28.95% para IgG2, 1.09% para IgG3 y 66.06% para IgG4.
m-cont: microesferas control procesadas sin FVIII
m-FVIII: microesferas procesadas con FVIII

ses en pacientes pertenecientes a nuestro grupo poblacional se muestra en la Figura 2. Se observa que la IgG4 aumenta su contribución a medida que aumenta el nivel de la respuesta. Las otras tres subclases también participan en la respuesta pero con menores porcentajes. Fue sorprendente la participación de la IgG3. El análisis de correlación entre el título de inhibidores y la prevalencia de cada subclase, considerando el conjunto de todos los pacientes, demostró una mayor correlación en este orden IgG4 ($r=0.75$, $p=0.0001$) > IgG2 ($r=0.65$, $p=0.0001$) > IgG3 ($r=0.54$, $p=0.001$) > IgG1 ($r=0.52$, $p=0.001$).

En la Figura 3 se observa el cambio de prevalencia de subclases que acompañó al cambio en el nivel de respuesta inmune al FVIII de dos pacientes (A y B) evaluados por el método de Bethesda y por CF en distintos momentos. La IgG4 incrementó el porcentaje de contribución paralelamente al aumento del nivel de anticuerpos.

Figura 2: Porcentaje de contribución de las cuatro subclases de IgG anti-FVIII en cuatro grupos de pacientes con HAS.



A: Grupo I: pacientes de baja respuesta con títulos de Ac-In* entre <0.5 UB/ml a 1 UB/ml

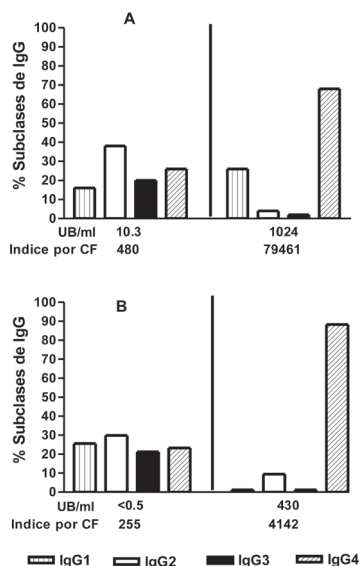
B: Grupo II: pacientes de alta respuesta pero con título negativo Ac-In* (<0.5 UB/ml)

C: Grupo II: pacientes de alta respuesta con títulos intermedios de Ac-In* (0.5-5 UB/ml)

D: Grupo II: pacientes de alta respuesta con altos títulos de Ac-In* (6-8200 UB/ml)

* al momento de extracción de la muestra.

Figura 3: Incremento de la contribución de la IgG4 anti-FVIII en el plasma de dos pacientes (A y B) con HAS en distintos momentos de la respuesta.



UB/ml: Nivel de Ac-In evaluados por el método de Bethesda

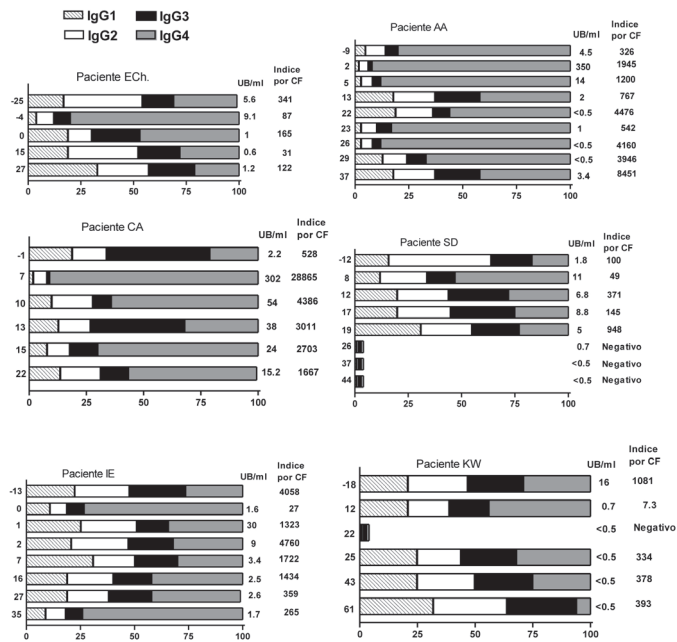
Indice por CF: Nivel de anticuerpos evaluados por Citometría de Flujo

Variaciones en el perfil de respuesta anti-FVIII en pacientes durante el TIT

Los 6 pacientes en TIT fueron evaluados antes del tratamiento y en distintos momentos durante el mismo. Para todas las muestras extraídas se estudió el nivel del inhibidor, el Índice por CF y la distribución de subclases. La Figura 4 muestra los resultados obtenidos. En 5 de los pacientes se logró un descenso del título de inhibidor, por lo menos hasta la última muestra extraída. Hubo discrepancia entre los resultados obtenidos por los dos procedimientos excepto para SD para quien el TIT logró erradicar el anticuerpo. En este paciente la prevalencia de la IgG4 fue disminuyendo con el tratamiento. En los pacientes ECh, AA y KW también se observó este efecto pero no lograron todavía la negativización completa a los 27, 37 y 61 meses de iniciado el tratamiento., respectivamente. De estos tres pacientes, KW erradicó el inhibidor pero no se negativizó por CF indicando la presencia de anticuerpos

no neutralizantes. Ech y AA persisten con títulos bajos por ambas metodologías pero sin anamnesis. Esto se observa también en IE pero con IgG4 prevalente. El paciente CA debió abandonar el TIT, por razones no médicas, a pesar de que el título de anticuerpos fue descendiendo como efecto del mismo.

Figura 4: Distribución de subclases (%) de IgG anti-FVIII, niveles de inhibidor (UB/ml) e Índice por CF en 6 pacientes con HAS durante el TIT. En el eje de la izquierda de cada gráfico están indicados los meses de TIT tomando como 0 el mes del comienzo.



TIT: Tratamiento de Inducción de Tolerancia. Los pacientes reciben 100 ó 200 UI/ml de FVIII tres veces por semana durante 1 a 3 años.

DISCUSIÓN

Este estudio analiza la respuesta inmune humoral al FVIII en pacientes con Hemofilia A Severa de nuestro grupo poblacional. Hemos empleado un

inmunométodo desarrollado en nuestro laboratorio que detecta Ac-In y Ac-NIn. Estos últimos son importantes ya que pueden acelerar la depuración del factor exógeno, alterando su perfil farmacocinético y farmacodinámico como ocurre con otras proteínas de uso terapéutico^{14,15}. Los datos presentados en la Tabla 1 muestran que la CF detectó anticuerpos aun en pacientes negativos por el método funcional, esto estaría indicando una mayor sensibilidad de la metodología o la presencia de Ac-NIn en estos pacientes. Las mayores discrepancias se encontraron en los pacientes con bajos títulos.

Con nuestra metodología, la subclase prevalente en pacientes con alto título fue la IgG4, dato que concuerda con todos los grupos de trabajo. Se ha asociado a esta subclase con el anticuerpo

característico cuando hay exposición crónica al antígeno como es el caso de las alergias y de los pacientes con hemofilia que reciben tratamiento con el FVIII¹⁶. En nuestro caso la IgG2 le siguió en importancia, resultado similar a los obtenidos por Towfighi empleando la técnica de ELISA⁸. En otros grupos poblacionales se ha indicado a la IgG1 como segunda en importancia empleando otras metodologías, por ejemplo ELISA por el grupo de Whelan¹⁷, *immunoblotting* por Fulcher⁶, inmunoprecipitación por Hultin¹⁸. Gilles y col.⁷ separando los anticuerpos por inmunoabsorción al FVIII y caracterizándolos por ELISA, encontró todas las subclases involucradas aunque la IgG3 fue la menos representada. En nuestro estudio encontramos que la IgG3 participa en la respuesta en mayor porcentaje que en otros grupos poblacionales. Las diferencias en el perfil de distribución de subclases pueden ser atribuidas al empleo de distintas metodologías o a diferente prevalencia de determinados haplotipos en los distintos grupos estudiados. Además, se ha descrito que distintos polimorfismos de genes de la respuesta inmune representan factores de riesgo para el desarrollo de los inhibidores¹⁹, de la misma manera se puede pensar que los mecanismos regulatorios (células T o B, producción de citoquinas, etc) que llevan al cambio de subclase pueden tener distinta capacidad funcional en los distintos grupos de pacientes.

En pacientes de baja respuesta (Grupo I) y pacientes de alta respuesta (Grupo II) pero negativos en el momento de extracción por el método tradicional pero positivos por CF, hubo una contribución más homogénea de todos los subtipos de IgG. El cambio de subclase a IgG4, cuando se eleva el título de anticuerpos, fue corroborado en dos pacientes. No se conoce cuál es el mecanismo inmunológico responsable de diferenciar células B productoras de IgG4 específicas al FVIII. De acuerdo a nuestra hipótesis, el cambio de subclase a favor de la IgG4, con propiedades anti-inflamatorias, se induciría

por la acción de mecanismos regulatorios para evitar los procesos dañinos que podrían desencadenarse cuando prevalecen las subclases con características inflamatorias. Está descrito que la IgG4 no fija complemento y tiene menor afinidad por los receptores Fc que el resto de las otras subclases.^{9,20}

El seguimiento de pacientes en TIT ha permitido corroborar que el descenso de anticuerpos es paralelo al descenso de la prevalencia de la IgG4. Estos pacientes lograron éxito total o parcial con el TIT. Es importante destacar los valores positivos encontrados por CF al final del tratamiento

cuando la medición del Ac-In daba resultados negativos. La presencia de estos Ac-NIn explicaría la baja recuperación del FVIII infundido en estos pacientes. Llama la atención el paciente AA en cuyo plasma no se detectaron Ac-In desde los 26 meses de iniciado el TIT a pesar de que la CF seguía dando positiva en dos muestras sucesivas, a los 37 meses se volvió a detectar Ac-In (3.4 UB/ml). Esto indicaría que el método para medir Ac-In no es suficientemente sensible o permanecen en plasma Ac-NIn, solo detectados por CF. Además, estaría reforzando la necesidad de evaluar la respuesta por ambos métodos.

En vista de todos los resultados obtenidos en este trabajo, resaltamos la necesidad de incorporar como complemento de las mediciones del inhibidor por el método funcional, este inmunométodo no solamente para el seguimiento de los pacientes en TIT sino también para el control de los pacientes con Hemofilia A Severa que reciben tratamiento con FVIII ya que la presencia de anticuerpos, no siempre detectados por el ensayo funcional es razón para que el médico tratante evalúe el cambio el protocolo del tratamiento de profilaxis.

RESUMEN

En este trabajo se estudió la distribución de subclases de IgG específicas al FVIII en 56 pacientes con Hemofilia A Severa (HAS). También se incluyeron 6 pacientes antes y durante el tratamiento de inducción de tolerancia inmune (TIT) que reciben para erradicar los anticuerpos. El espectro de anticuerpos que se desarrollan en respuesta al FVIII es muy amplio y los que tienen capacidad inhibitoria (Ac-In) solo representan una parte de la respuesta. Los Ac-In son evaluados por el método funcional de rutina (Bethesda) Los anticuerpos no inhibitorios (Ac-NIn), importantes clínicamente porque aceleran la depuración del factor solo pueden ser detectados

con el empleo de un inmunométodo. Nosotros desarrollamos una metodología que combina la citometría de flujo con el empleo de microesferas a las que se les ha adsorbido el FVIII. Este ensayo detecta Ac-In y INn y permite la identificación de la inmunoglobulina involucrada en la respuesta. Cada clase y/o subclase de inmunoglobulina tiene propiedades estructurales y funcionales distintas y de estas propiedades depende su efectividad como anticuerpo. En otros grupos de pacientes se encontró a la IgG4 asociada con altos títulos y a fallas en el TIT. Diluciones de los plasmas se enfrentaron con las microesferas y los anticuerpos se revelaron con anti-IgG total, o anti-IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 biotiniladas seguida por estreptavidina conjugada a un fluorocromo. El método empleado permitió detectar anticuerpos en plasmas con Bethesda negativo. La IgG4 fue la subclase prevalente en pacientes con alto título de inhibidores, seguida por la IgG2. La contribución de las IgG1 e IgG3 fue variable y se observó más en pacientes con bajos títulos. El incremento de la IgG4 paralelamente al incremento de Ac-In se pudo demostrar en dos pacientes que fueron controlados en distintos momentos. Una reducción de la contribución de la IgG4 se observó en 5/6 pacientes en TIT. Ac-INn fueron detectados al final del TIT cuando los Ac-In ya se habían negativizado.

Se sugiere el empleo de este inmunométodo como complemento del método funcional de rutina para el monitoreo de los pacientes con HAS e inhibidores.

ABSTRACT

Up to one-third of Severe Hemophilia A patients develop factor VIII allo-antibodies (Inhibitors). Most FVIII-neutralizing antibodies are IgG. There are different profiles of specific IgG subclasses, depending on the group of patients studied. The IgG subclasses exhibit different functional activities. IgG4 has been associated with anti-inflammatory activity and IgG1, IgG2 and IgG3 are considered inflammatory immunoglobulins.

The aim of this work was to describe the humoral immune response to FVIII in Severe Hemophilia A patients belonging to our institution. We have set up an immunomethod by flow cytometry (FC) that detects all kind of antibodies, inhibitors and non-inhibitors and facilitates identification of the specific anti-FVIII IgG subclasses. We studied 56 patients with history of inhibitors measured by Bethesda assay and 6 patients who received immune tolerance

induction treatment (ITI) to eradicate the inhibitors. We detected IgG anti-FVIII in 7/11 plasmas with Bethesda <0.5 UB/ml and 42/45 in those with >0.5 UB/ml. IgG4 and IgG2 correlated well with inhibitor titers. We found more IgG3 in our group of patients compared to previous reports. The shifting towards IgG4 was observed in two patients according to increasing inhibitor titers. Although inhibitors were not detected by Bethesda, antibodies were found by FC during ITI. The relative contribution of IgG4 decreased in 5/6 patients during partial or complete successful ITI.

Taking all these results into account, we propose our FC method as a supplementary or complementary approach to the Bethesda assay for a better monitoring of the anti-FVIII humoral immune response in Hemophilia A patients.

BIBLIOGRAFIA

1. Gilles J., Saint-Remy J. *Healthy Subjects Produce both Anti-Factor VIII and Specific Anti-Idiotypic Antibodies*. J. Clin. Invest. 94:1496-1505 (1994).
2. Dazzi F., Tison T., Vianello T., Radossi P., Zerbinati P., Carraro P., Poletti A., Girolami A. *High incidence of anti-FVIII antibodies against non-coagulant epitopes in haemophilia A patients: a possible role for the half-life of transfused FVIII*. British Journal of Haematology, 93: 688-693 (1996).
3. Verbruggen B., Novakova I., Wessels H., Boezeman J., van der Berg M., Mauer-Bunschoten E. *The Nijmegen modification of the Bethesda assay for Factor VIII:C inhibitors: Improved specificity and reliability*. Thromb Haemost. 73²: 247-51 (1995).
4. Perez Bianco R., Castro Ozelo M., Ribeiro Villaga P., Solano M., Jimenez Cruz G., Martinez Murillo C., Garcia Chavez J., Mendoza S., Rodriguez Grecco I., Ruiz-Saez A. *Diagnosis and treatment of congenital hemophilia with inhibitors a Latin American perspective*. Medicina (Buenos Aires) 68: 227-42 (2008).
5. Kavanagh M., Wood C., Davidson J. *The immunological characterization of human antibodies to Factor VIII isolated by immuno-affinity chromatography*. Thromb Haemost. 45(1) 60-4 (1981).
6. Fulcher C., de Graaf Mahoney S., Zimmerman T. *FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting*. Blood 69⁵: 1475-80 (1987).
7. Gilles J., Arnout J., Vermynen J., Saint-Remy J. *Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction*. Blood 82⁸: 2452-61 (1993).
8. Towfighi F., Gharagozlou S., Sharifian R., Kazemnejad A., Esmailzadeh K., Reza Managhchi M., Shokri F. *Comparative measurement of anti-Factor VIII antibody by Bethesda assay and ELISA reveals restricted isotype profile and epitope spe-*

- cificity*. *Acta Haematol.* 114: 84-90 (2005).
9. Schroeder H., Cavacini L. *Structure and function of immunoglobulins*. *J Allergy Clin Immunol.* 125:S41-52 (2010).
 10. van Helden P., van der Berg H., Gouw S., Kaijen P., Zuurveld M., Mauser-Bunschoten E., Aalberse R., Vidarsson G., Voorberg J. *IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A*. *British Journal of Haematology* 142: 644-52 (2008).
 11. Aalberse R., Stapel S., Schuurman J., Rispens T. *Immunoglobulin G4: an odd antibody*. *Clin Exp Allergy* 39: 469-77 (2009).
 12. Lollar P. *Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: Factor VIII and Factor IX.* *J Thromb Haemost* 2: 1082-95 (2004).
 13. Irigoyen M., Primiani L., Felippo M., Candela M., Perez Bianco R., de Bracco M., Galassi N. *A flow cytometry evaluation of anti-FVIII antibodies: correlation with ELISA and Bethesda assay*. *Haemophilia* 17: 267-74 (2011).
 14. Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D' Haens G, Carbonez A, Rutgeerts P. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med.* 348(7):601-8. (2003)
 15. Suiter T., Mannucci P., Kempton C., Laffan M., Romond E., Shapiro A., Birschmann I., Ragni M., Gill J., Yee T., Klamroth R., Horling F., Reipert B., Turecek P., Varadi K., Chapman M., Engl W., Wong W., Ewenstein B., and rhVWF Study Team. *Detection of Non Inhibitory Binding Antibodies to Von Willebrand Factor Affecting the Clearance of VWF:Ag in Von Willebrand Disease Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts); 118: 2275 (2011).
 16. Aalberse R., van der Gaag R., Leewen J. *Serologic aspects of IgG4 antibodies. I Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response*. *J Immunol* 130: 722-26 (1983).
 17. Whelan S., Hofbauer C., Horling F., Allacher P., Wolfsegger M., Oldenburg J., Male C., Windyga J., Tiede A., Schwarz H., Scheiflinger F., Reipert B. *Distinct characteristics of antibody response against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients*. *Blood* 121: 1039-1048 (2013).
 18. Hultin M., London F., Shapiro S., Yount W. *Heterogeneity of Factor VIII antibodies: Further immunochemical and biologic studies*. *Blood* 49: 807-17 (1977).
 19. Astermark J. *Inhibitor development: patient-determined risk factors*. *Haemophilia* 16: 66-70 (2010).
 20. Bruhns P., Iannascoli B., England P., Mancardi D., Fernandez N., Jorieux S., Daëron M. *Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for IgG subclass*. *Blood* 113: 3716-3725 (2009).

FACTORES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN, SOBREVIDA, MIGRACIÓN Y METÁSTASIS DE LA CÉLULA TUMORAL MAMARIA HUMANA EN HUESO Y SU IMPORTANCIA PRONÓSTICO.

Labovsky V.¹, Martínez L.¹, Calcagno ML.², Davies KM.³, Wernicke A.³,
García-Rivello H. ³, Fernández-Vallone VB. ¹, Chasseing NA. ¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina. ² Cátedra de Bioestadística, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina y

³Departamento de Patología, Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCIÓN

El 70% de las pacientes con cáncer de mama (PCM) avanzado desarrolla metástasis (MTs) en médula ósea (MO)/hueso y el 20% alcanza una supervivencia de 5 años^{1,2}. El 30% de las PCM con estadio temprano presentan micrometástasis en MO, pudiendo ser un factor pronóstico de menor período libre de enfermedad. Las MTs óseas (MTsO) son el resultado de una interacción entre las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM) y el microambiente de MO/hueso. Para desarrollar una MTsO debe existir un desbalance entre los procesos de osteogénesis-osteoclastogénesis, que en el caso de las PCM es de tipo osteolítica^{1,2}. La osteoclastogénesis y resorción ósea aumentada en las PCM avanzado, podría ser consecuencia directa de CEpTM en MO y/o de una deficiente capacidad de diferenciación osteoblástica/osteocítica de las células madre mesenquimales (MSC) de MO. Sin descartar, un efecto indirecto de factores solubles liberados por las CEpTM circulantes y/o del tumor primario (OPG, RANKL, Dkk-1, IL-6, IL-8, IL-11, M-CSF, etc) en MO³⁻⁸. Existe una interacción activa y recíproca entre las CEpTM y las MSC de MO. Las CEpTM liberan y/o expresan en membrana RANKL, SDF-1 y CCL2, entre otros, que atraen a las MSC o fibroblastos activados del tumor (TAF) de MO que expresan los receptores (R) RANK, CXCR4 y CCR2 respectivamente, al tumor primario o a un nicho premetastásico distinto de MO^{9,10}. Y de esta manera, las MSC y/o TAF favorecen la proliferación y supervivencia de las CEpTM, por liberar factores como OPG, RANKL, SDF-1, IL-6, M-CSF, colágeno I y III, fibronectina, proteoglicanos, entre otros, contribuyendo al desarrollo del tumor de mama y su progresión hacia una futura MTs¹¹.

Además, las CEpTM pueden expresar RANK y CXCR4, permitiendo su migración desde el tumor primario a MO/hueso por acción de RANKL y SDF-1, respectivamente, liberados por las MSC y TAF de MO y/o microambiente tumoral (MT) y los osteoblastos inmaduros de MO/hueso^{2,6,9,12,13}. Incluso el RANKL podría ser liberado por Linfocitos B y T circulantes y/o del microambiente hematopoyético o tumoral. Se demostró que la expresión de RANK en la CEpTM del tumor primario, es marcador predictivo de ocurrencia de MTsO y de menor período libre de aparición de desórdenes óseos^{14,15}. En los últimos años, ha cobrado importancia el sistema OPG-RANKL-TRAIL en la regulación de la proliferación, supervivencia y migración de la CEpTM, favoreciendo el desarrollo del tumor primario y la aparición de las MTsO. Pero los resultados son contradictorios y no está definido cómo se modifica su expresión y liberación durante la evolución tumoral, ni tampoco se conoce como inciden las MSC en este sistema^{16,17}.

De lo expuesto y debido a que los parámetros de pronóstico clásicos [en este caso: edad, tamaño tumoral, grado histológico, el estado de los receptores hormonales estrógeno (RE) y progesterona (RP) y Her2/neu] no siempre predicen adecuadamente la evolución clínica-patológica de las PCM y su respuesta al tratamiento adyuvante, se planteó el siguiente objetivo: “Estudiar en las CEpTM nuevos parámetros que permitan avanzar en el conocimiento de los procesos que favorecen la evolución del tumor primario de mama y la aparición de futuras MTs, en especial a MO/hueso, al estimular la proliferación, supervivencia y migración de las CEpTM especialmente en los estadios tempranos de la enfermedad”. De este modo, se propone incrementar las herramientas empleadas como marcadores tumorales con el fin de contar con mejores parámetros para predecir el riesgo de MTsO, pronóstico tumoral y evaluar en un futuro cercano posibles respuestas a diferentes terapias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudiar en biopsias de tumores primarios de PCM y en tejido mamario no neoplásico los siguientes objetivos:

- i) La expresión de OPG, TRAIL, los receptores (R) de TRAIL (TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4), RANKL, RANK (RANKL-R), SDF-1, CXCR4 (SDF-1-R), IL-6, IL-6R, M-CSF y M-CSF-R (CD115) en las CEpTM y en las células epiteliales mamarias (CEpM).

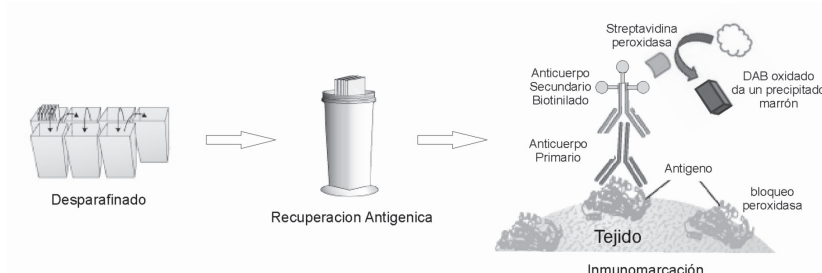
- ii) Analizar la posible asociación entre los parámetros de pronóstico no clásicos (evaluados en el objetivo i) con los parámetros de pronóstico clásicos [edad, tamaño tumoral, grado histológico (score de Nottingham), el estado de los receptores hormonales (RE y RP) y Her2/neu.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Pacientes:** se seleccionaron PCM ductal infiltrante, estadio clínico-patológico I/II (n=20), libres de tratamiento adyuvante y muestras controles, no neoplásicas, (CN, n=7) (tejido mamario no neoplásico al estudiar la biopsia), sin compromiso medular, ni inmunohematológico. Se siguió el sistema de clasificación TNM de la Unión Internacional de Lucha contra el Cáncer. Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado. Este trabajo se desarrolló bajo los principios de la Declaración de Helsinki.
 - **Muestras de tejido:** fueron extraídas de la mama en el momento de la cirugía de las PCM y de los tejidos no neoplásicos. Las muestras fueron incluidas en parafina previa fijación con formol neutro al 10% y se trabajó con cortes de 4µm. Las muestras fueron cedidas del Departamento de Patología del Hospital Italiano (Dr. Davies y Dr. García-Rivello)
 - **Parámetros de pronóstico clásicos:** edad, tamaño tumoral, grado histológico (score de Nottingham), RE y RP y Her2/neu fueron evaluados por los Patólogos del Hospital Italiano.
- i) **Estudio de la expresión de OPG, TRAIL, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANKL, RANK, SDF-1, CXCR4, IL-6, IL-6R, M-CSF y CD115.** se realizó por la técnica de Inmunohistoquímica (Figura 1), utilizando los siguientes anticuerpos (Acs) primarios: anti-OPG (R&D, AF805, cabra), anti-TRAIL (R&D, MAB687, ratón), anti-TRAIL-R1 (R&D, AF347, cabra), anti-TRAIL-R2 (R&D, MAB6311, ratón), anti-TRAIL-R3 (R&D, MAB6301, ratón), anti-TRAIL-R4 (R&D, AF633, cabra), anti-RANKL (R&D, MAB626, ratón), anti-RANK (R&D, MAB683, ratón), anti-IL-6 (R&D, MAB2061, ratón), anti-IL-6R (Invitrogen, AHR0961, ratón), anti-SDF-1 (R&D, MAB350, ratón), anti-CXCR4 (R&D, MAB172, ratón), anti-M-CSF (Abcam, ab9693, conejo), anti-CD115 (R&D, MAB350, rata) y anti-AE1AE3 (Dako, N1590, ratón) (control positivo con mayor intensidad de expresión en las CEpTM). Controles negativos sin Ac primario o con Acs inespecíficos del mismo isotipo que los Acs primarios utilizados:

IgG1 de ratón (R&D, MAB350), Igs de ratón (ZYMED, 08-6599), IgG de cabra (R&D, AB-108-C), Igs de conejo (DAKO, X0936) y IgG1 de rata (R&D, AB005).

Figura 1: Inmunohistoquímica



- **Lectura de los resultados:** fue realizada a ciego por dos Patólogos. Se consideró como muestra positiva para cada marcador a todo tejido que presentara ³ 10% de las CEpTM o CEpM teñidas.
- **Análisis Estadístico:** fue realizado por la **Bioquímica Calcagno ML**. Para comparar:

1) Las expresiones de los parámetros no clásicos entre las PCM y tejido no neoplásico, se utilizó el test exacto de Fisher. Los resultados se expresan como el porcentaje de presencia del marcador dentro de cada grupo. En aquellas comparaciones en las que el $p < 0,05$ se detecta diferencia significativa en el porcentaje de presencia del marcador entre los dos grupos.

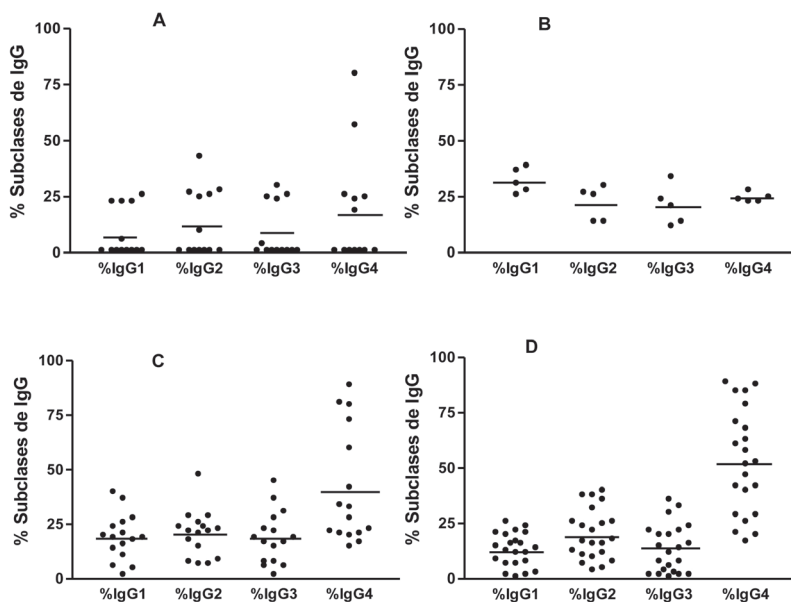
2) Los parámetros no clásicos versus los clásicos con variables dicotómicas, se calculó el coeficiente kappa, pues interesa ver del total cuáles son los pacientes que tienen, o bien ambos positivos o bien ambos negativos, lo cual indica asociación entre los dos parámetros. Cuando el intervalo de confianza del 95% no incluye al cero, se puede afirmar que existe asociación entre ese par de marcadores.

3) Si el parámetro no clásico estaba asociado con uno clásico que fuera variable continua, se utilizó un test no paramétrico de Mann-Whitney. Se analizó el nivel del parámetro clásico entre el grupo que expresa y el grupo que no expresa el marcador no clásico. **Software: InfoStat y SPSS 18.0.** Se considerará significativa toda $p < 0,05$.

RESULTADOS

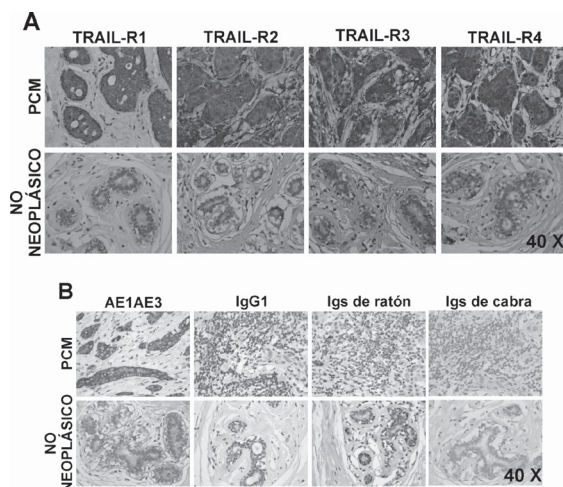
- i) Estudio de la expresión de OPG, TRAIL, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANKL, RANK, SDF-1, CXCR4, IL-6, IL-6R, M-CSF y CD115 en las CEpTM y en las CEpM
- a) **Expresión de OPG y TRAIL:** se encontró expresión positiva del 71,43% (10/14) para OPG y 90% (18/20) para TRAIL en las PCM y del 33,33% (2/6) para OPG y 71,43% (5/7) para TRAIL en las muestras no neoplásicas (Figura 2A). En estas muestras se observó tinción positiva para AE1/AE3 y tinción negativa cuando se incubaron con los controles de isotipo correspondientes (Figura 2B).

Figura 2: Expresión de OPG y TRAIL



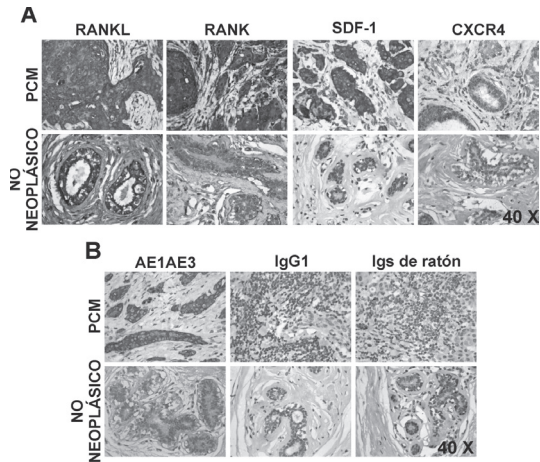
b) Expresión de TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 y TRAIL-R4: se encontró expresión positiva del 15,00% (3/20) para TRAIL-R1, 65,00% (13/20) para TRAIL-R2, 95,00% (19/20) para TRAIL-R3 y 100% (20/20) para TRAIL-R4 en las PCM y del 14,29% (1/7) para TRAIL, TRAIL-R1 y TRAIL-R3 y 28,57% (2/7) para TRAIL-R2 y TRAIL-R4 en las muestras no neoplásicas (Figura 3A). En estas muestras se observó tinción positiva para AE1AE3 y tinción negativa cuando se incubaron con los controles de isotipo correspondientes (Figura 3B).

Figura 3: Expresión de TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 y TRAIL-R4



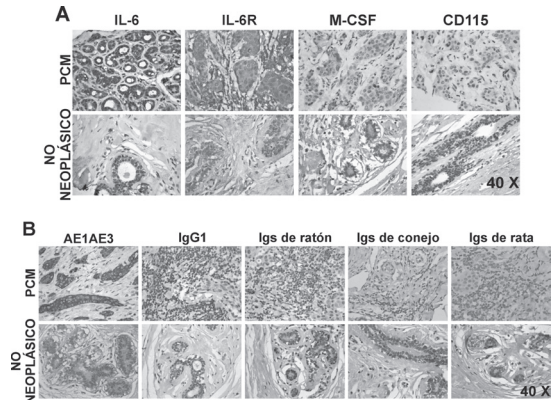
c) Expresión de RANKL, RANK, SDF-1 y CXCR4: se encontró expresión positiva del 70,00% (14/20) para RANKL, 90,00% (18/20) para RANK, 75,00% (15/20) para SDF-1 y 95,00% (19/20) para CXCR4 en las PCM y 57,14% (4/7) para RANKL, 42,86% (3/7) para RANK y 20,00% (1/5) para SDF-1 y CXCR4 en las muestras no neoplásicas (Figura 4A). Las muestras no neoplásicas presentaron una expresión menos intensa para RANK en comparación con las PCM donde encontramos, en todos los casos, una expresión intensa para estas moléculas. En estas muestras se observó tinción positiva para AE1AE3 y tinción negativa cuando se incubaron con los controles de isotipo correspondientes (Figura 4B).

Figura 4: Expresión de RANKL, RANK, SDF-1 y CXCR4



d) Evaluación de la expresión de IL-6, IL-6R, M-CSF y CD115: se encontró expresión positiva del 75,00% (15/20) para IL-6, 100,00% (17/17) para IL-6R, 30,00% (6/20) para M-CSF y 0% (0/20) para CD115 en las PCM y del 14,29% (1/7) para IL-6, 71,43% (5/7) para IL-6R, 0% (0/7) para M-CSF y 0% (0/7) para CD115 (M-CSF-R) en las muestras no neoplásicas (Figura 5A). En estas muestras se observó tinción positiva para AE1AE3 y tinción negativa cuando se incubaron con los controles de isotipo correspondientes (Figura 5B).

Figura 5: Expresión de IL-6, IL-6R, M-CSF y CD115



e) Prevalencia de OPG, TRAIL, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANKL, RANK, SDF-1, CXCR4, IL-6, IL-6R, M-CSF y CD115: TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, IL-6, CXCR4 y SDF-1 presentan una prevalencia significativamente mayor en PCM en comparación con las muestras no neoplásicas ($p=0.0002$, $p=0.0003$, $p=0.0239$, $p=0.0087$, $p=0.0019$ y $p=0.0403$, respectivamente) (Tabla 1 y 2) test de Fisher.

Tabla 1

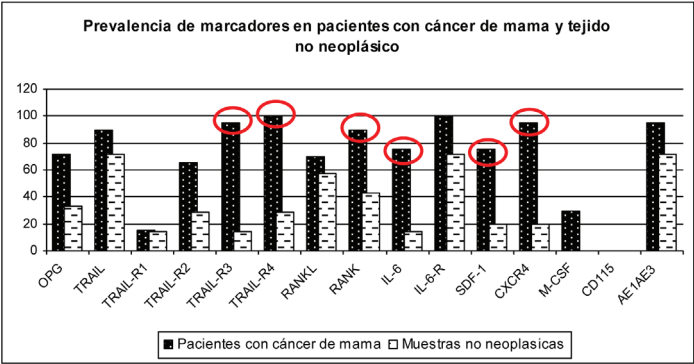


Tabla 2

Marcador	Normales (%)	PCM (%)	p-valor
OPG	33,33	71,43	0,5147
TRAIL	71,43	90,0	0,5453
TRAIL-R1	14,29	15,0	>0,99
TRAIL-R2	28,57	65,0	0,185
TRAIL-R3	14,29	95,0	0.0002
TRAIL-R4	28,57	100,0	0.0003
RANKL	57,14	70,0	0,6527
RANK	42,86	90	0.0239
IL-6	14,29	75	0.0087
IL-6R	71,43	100,0	0,0646
CXCR4	20,0	95,0	0.0019
SDF-1	20,0	75,0	0.0403
M-CSF	0	30,0	0,5392
CD115	0	0	-
AE1AE3	71,43	100,0	0,0646

- ii) Análisis de la posible asociación entre los parámetros de pronóstico no clásicos (OPG, TRAIL, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANKL, SDF-1, CXCR4, IL-6, IL-6R, M-CSF y CD115) con los parámetros de pronóstico clásicos (edad, tamaño tumoral, grado histológico, RE, RP y Her2/neu)

a.1.) Asociación de los parámetros no clásicos con los clásicos (RE, RP y Her2/neu) que tenían valores dicotómicos (positivos o negativos) con el coeficiente kappa: TRAIL-R1, TRAIL-R2 y M-CSF se asocia significativamente con Her2/neu [Coeficiente Kappa: -0.253 (-0.445;-0.061); 0.354 (0.036;0.672) y -0.354 (-0.578;-0.129), respectivamente] en las PCM (Tabla 3). No se encontró asociación entre el resto de los parámetros.

Tabla 3: TRAIL-R1, TRAIL-R2 y M-CSF se asocian con Her2/neu

<u>Marcador no clásico</u>	<u>Marcador clásico</u>	<u>Ambos negativos</u>	<u>Ambos positivos</u>	<u>Coeficiente kappa (IC95%)</u>
<u>TRAIL-R1</u>	<u>Her2/neu</u>	58.8	0	<u>-0.253 (-0.445;-0.061)</u>
<u>TRAIL-R2</u>	<u>Her2/neu</u>	41.2	23.5	<u>0.354 (0.036;0.672)</u>
<u>M-CSF</u>	<u>Her2/neu</u>	47.1	0	<u>-0.354 (-0.579;-0.129)</u>

a.2.) Asociación de los parámetros no clásicos con los clásicos (edad, tamaño tumoral y grado histológico) que tenían valores continuos con el test de Mann-Whitney. Se compara la variable de la segunda columna (edad) con los dos grupos de la variable categórica de la primera columna (n1: PCM que no expresan TRAIL-R2 y n2: PCM que expresan TRAIL-R2).

La expresión de TRAIL-R2 se asoció con la edad de las PCM con una media de 71,5 años (n2: rango de 55-81 años), p (2 colas): 0,0451 (Tabla 4). No se encontró asociación entre el resto de los parámetros.

Tabla 4: TRAIL-R2 se asoció con la edad en las PCM

No clásico	Clásico	Grupo 1	Grupo 2	n1	n2	Mediana1	Mediana2	W	P (2 colas)
TRAIL-R2	EDAD	0	1	7	10	61	71,5	42,5	0,0451

n1: rango de edad de 46-67 años.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Pudimos observar que las CEpTM de las PCM presentaron una expresión significativamente mayor para TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, SDF-1, CXCR4 e IL-6 que las CEpM de muestras no neoplásico. La expresión del TRAIL-R3 y TRAIL-R4 en las CEpTM podrían producir la resistencia de las mismas a la acción del TRAIL, sugiriendo un efecto anti-apoptótico (18). Como comentamos, la expresión de RANK y CXCR4 en las CEpTM permitiría su migración desde el tumor primario a MO/hueso por acción de RANKL y SDF-1, respectivamente, liberados por las MSC y TAF de MO y/o microambiente tumoral (MT) y los osteoblastos inmaduros de MO/hueso (2,5,6,9,12,13). Más aún, se demostró que la expresión de RANK en la CEpTM del tumor primario, es marcador predictivo de ocurrencia de MTsO y de menor período de tiempo de aparición de desórdenes óseos (14,15). RANKL cumple un rol importante en el proceso de quimiotaxis entre las CEpTM circulantes y el microambiente óseo, permitiendo que las CEpTM que expresan RANK migren a hueso (19). Recientemente se determinó, en un modelo pre-clínico, que el tratamiento con el anticuerpo anti-RANKL (denosumab) reduce la formación del cáncer de mama y disminuye el desarrollo de MTs óseas y en pulmón (19). Nosotros no encontramos aumento de la expresión de RANKL en las CEpTM en comparación con las muestras no neoplásicas. Sin embargo, eso no quiere decir que no expresen y liberen RANKL o que sea producido por otras células como ya hemos mencionado anteriormente. Por lo tanto, la determinación del factor RANKL en las PCM podría utilizarse para implementar nuevas terapéuticas en la prevención del desarrollo del cáncer de mama y en la aparición de las futuras MTs. Además, la expresión y liberación de SDF-1 en las CEpTM puede atraer a las MSC o TAF de MO al tumor primario o a un nicho pre-metastásico distinto de MO (9,10). Y, la expresión y liberación de IL-6 por las CEpTM podría ayudar al desarrollo de futuras MTsO por favorecer la formación de preosteoclastos en el tumor primario (20).

También encontramos que la expresión de TRAIL-R1, TRAIL-R2 y M-CSF en las CEpTM se asoció con Her2/neu que es un parámetro clásico no favorable, pues se relaciona con las MTs en ganglio. En concordancia con nuestros resultados, un estudio previo encontró que las PCM de tipo ductal infiltrante Her2/neu positivas tenían altos niveles de expresión del TRAIL-R1 y TRAIL-R2 (21). Un estudio reciente ha demostrado que varias líneas celulares de cáncer de mama humanas con características metastásicas, son sensibles a la apoptosis mediada por TRAIL-R2 (22). Además, se ha demostrado que el

tratamiento de estas líneas con lexatumumab, anticuerpo anti-TRAIL-R2 que activa la apoptosis, reduce *in vivo* las MTs, principalmente las de pulmón (23). Por lo tanto, la identificación de la expresión del receptor de muerte TRAIL-R2, podría ser una herramienta prometedora como blanco terapéutico en las células metastásicas y de esta manera ayudar a disminuir las MTs en las PCM.

La expresión de M-CSF también podría ayudar al desarrollo de futuras MTsO por favorecer la formación de preosteoclastos (20). Y además, la liberación del M-CSF por parte de las CEpTM favorece la quimiotaxis de monocitos al tumor primario, los cuales se transforman en TAM y los mismos liberan EGF que se une al EGF-R (Her2/neu) de la CEpTM, favoreciendo su proliferación y expresión de CXCR4. A su vez, la unión del ligando SDF-1 (posiblemente liberado por los TAF y/o MSC del MT y por las CEpTM) a CXCR4, induciría la migración de las CEpTM fundamentalmente a hueso, aunque también a hígado y/o pulmón (11,24,25). Entonces, la detección de expresión del M-CSF conjuntamente con HER2/neu en las CEpTM podría acelerar la aparición de MTsO en estas PCM.

Por lo tanto, ya que los parámetros de pronóstico clásicos evaluados en nuestro trabajo: edad, tamaño tumoral, grado histológico, RE y RP y Her2/neu, no siempre predicen adecuadamente la evolución clínica de la PCM y su respuesta al tratamiento adyuvante, nos surgió la necesidad de estudiar otros factores (OPG, TRAIL, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANKL, RANK, SDF-1, CXCR4, IL-6, IL-6R, M-CSF y CD115) implicados en la regulación de la proliferación, sobrevida, migración y futuras MTsO de las CEpTM durante la progresión del tumor de mama. El estudio de estos factores sobre las CEpTM, con su asociación con los parámetros de pronóstico clásicos en las biopsias de los tumores de las PCM, permitirá obtener información del comportamiento del tumor y orientar al Oncólogo y Patólogo-Mamario en la terapéutica a implementar. Finalmente, la identificación de nuevos marcadores implicados en la proliferación, sobrevida, migración y futuras MTsO (al favorecerse la formación de preosteoclastos por la liberación de RANKL, IL-6 y M-CSF, entre otros), permitirá reducir la mortalidad al identificar a las mujeres con riesgo óseo, predecir el pronóstico y evaluar posibles respuestas a diferentes terapias.

ABSTRACT

While breast cancer (BC) is the major cause of death among women worldwide, there is no guarantee of better patient survival because many of

these patients develop primarily metastases, despite efforts to detect them in their early stages. The classic parameters (age, ER, PR, Her2/neu, tumor size and histological grade) have strong prognostic and predictive values but are not enough to prevent BC patients (BCP) from developing metastasis. Our objective has been to evaluate simultaneously the expression of non-classical parameter (**OPG, TRAIL, RANKL, SDF-1, IL-6, M-CSF, and their receptors**) in breast epithelial cells (BEpC) related to BC progression and metastasis with the classic parameters in BCP.

Material and methods

Primary breast tumor from 20 BCP with infiltrative ductal carcinoma in early stage (I-II) and 10 non-neoplastic breast tissues (controls) were evaluated by immunohistochemistry. Fisher's Exact Test was used to analyze associations between both groups. Kappa coefficients and Mann-Whitney test were used to evaluate association between non-classical and classical parameters in BCP ($p < 0.05$).

Results

TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, IL-6, CXCR4 and SDF-1 expression have a significant higher prevalence in BCP than controls ($p = 0.0002$, $p = 0.0003$, $p = 0.0239$, $p = 0.0087$, $p = 0.0019$ and $p = 0.0403$, respectively). Moreover, 65% of BC samples (3/19) that expressed TRAIL-R2 was associated with major age ($p = 0.0451$) and TRAIL-R1, TRAIL-R2 and M-CSF expression was associated with HER2 $[-0.253(-0.445; -0.061)$; $0.354(0.036; 0.672)$ and $-0.354(-0.578; -0.129)$, respectively] in BCP. No association was found between the rest of non-classical and classical parameters.

Discussion

The major expression of TRAIL-R3 and TRAIL-R4 in BC cells could produce the TRAIL resistance, suggesting an anti-apoptotic effect. RANK and CXCR4 expression in BC cells allow their migration from the primary tumor to bone marrow/bone by action of RANKL and SDF-1 released by stromal cells and/or them. TRAIL-R1/R2 and M-CSF expression were associated with Her2/neu. The simultaneous expression of M-CSF and Her2/neu could increase the occurrence of metastasis in BCP. Since these ligands and their receptors are implicated in the regulation of proliferation, survival, migration and future bone metastasis during breast tumor progression, simultaneous assessment of non-classic and classic parameters in BCP could be useful in identifying patients with more aggressive tumors that are also at risk of bone metastasis, which may thus improve the available options for therapeutic intervention.

REFERENCIAS

1. Clin Cancer Res. 2005, 11:162-165.
2. Nature. 2006, 440:692-696.
- 3-Biochim Biophys Acta. 2004, 1704:49-57.
- 4-Cancer. 2003, 97 874-879.
- 5-Bull Cancer. 2006, 93:931-943.
6. Cancer Metastasis Rev. 2006, 25:635-644.
7. J Surg Res. 2001, 100:18-24.
8. Biochim Biophys Acta. 2010, 1805:17-24.
9. J Clin Invest. 2006, 116:1195-1201.
10. Stem Cells. 2006, 27:2614-2623.
11. Histochem Cell Biol. 2008, 130:1079-90.
12. Histol Histopathol. 2009, 24: 235-242.
13. Oncology. 2011, 80:225-231.
14. PLoS One. 2011, 6:e19234.
15. Clin Breast Cancer. 2011, 1:369-75.
16. J Clin Pathol. 2006, 59:56-63.
17. J Biol Chem. 2007, 282:31601-9.
18. Mol Cancer Res. 2008, 6:1861-1871.
19. Expert Rev Anticancer Ther. 2013, 13:195-201.
20. Cancer Manag Res. 2011, 3:177-89.
21. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2007, 69:716-23.
22. Breast Cancer Res Treat. 2009, 113:217-30.
23. Clin Cancer Res. 2011, 17:5005-15.
24. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2002, 7:147-62.
25. Cancer Res. 2009, 69:9498-506.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES PARASITARIAS NATURALES IMPLICADAS EN LA MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA.

Raúl Horacio Lucero, Daniel O. Hernández, Bettina L. Brusés, Laura B.
Formichelli, Carolina Cura, Alejandro Gabriel Schijman
Area de Biología Molecular del Instituto de Medicina Regional- Universidad
Nacional del Nordeste.

INTRODUCCIÓN:

La Enfermedad de Chagas, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, es un problema serio de salud que se estima afecta a ocho millones de personas infectadas y 64 millones en riesgo de infección a lo largo de 21 países de América Latina. Aproximadamente entre el 25-30% de las personas infectadas desarrollarán una Enfermedad de Chagas Crónica relacionado a un daño cardíaco y/o un megasíndrome digestivo. Factores tales como malnutrición, cepa parasitaria, y riesgo de reinfecciones, han sido relacionados con el pleomorfismo clínico y la evolución hacia un daño cardíaco irreversible. (Storino et al, Rev Saúde Pública 2002)

La infección afecta mayormente a las poblaciones rurales, aisladas geográficamente y con condiciones precarias habitacionales. Tales son las condiciones de la mayoría de los grupos aborígenes de la zona Noreste de Argentina donde conviven las etnias Wichi, Qom, Mocoví y Pilagá.

El objetivo de este estudio fué caracterizar genéticamente los aislados de *T. cruzi* en poblaciones de aborígenes por medio de métodos moleculares incluyendo la cuantificación de las cargas parasitarias y la identificación de las diferentes Unidades Discretas de Tipificación (UDTs) como también analizar la existencia de asociaciones de estos datos con las manifestaciones clínicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 494 individuos aborígenes de entre 1 a 78 años de edad. Todos ellos pertenecientes a localidades altamente endémicas para la Enfermedad de Chagas de las Provincias de Chaco y Formosa. A todos se les

extrajo sangre para estudios serológicos específicos para *T. cruzi* y PCR con primers kinetoplastídicos (amplicón 330pb).

Todos los individuos seropositivos fueron estudiados mediante estudios de PCR para la detección de ADN kinetoplastídico del parasite (Avila et al, 1989).

De manera de controlar la especificidad de la PCR, se estudiaron en paralelo un lote de 10 individuos seronegativos por cada localidad seleccionada.

Posteriormente todas las muestras PCR positivas fueron estudiadas mediante PCR en Tiempo Real (qPCR) mediante una reacción basada en la tecnología TaqMan (Duffy et al 2012). 5 μ ls de DNA fueron sometidos a la amplificación en presencia de FastStart Universal Probe Master Mix. (Roche Diagnostics GmbH Corp, Mannheim, Germany) usando primers cruzi 1, cruzi 2 y TaqMan probe cruzi 3, marcado con FAM.

La amplificación fué llevada a cabo en un Rotor-Gene 6000 (Corbett, UK).

La identificación de las Unidades Discretas de Tipificación (UDTs) fué llevada a cabo en todas las muestras kDNA positivas usando las estrategias dirigidas a marcadores genómicos nucleares como fuera reportado por Burgos et al. (2007).

Luego 10 μ ls de producto de kDNA-PCR fueron corridos en Gel de Agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% y teñido con Bromuro de etidio. La banda correspondiente a 330pb fué cortada y diluída en agua destilada 1:10. Posteriormente 3 μ ls de la dilución fueron usados como templado para una reacción de PCR en condiciones de baja astringencia y con un solo primer: LSSP-PCR (Vago et al, 1996). El análisis de las bandas fué realizado usando un sistema de documentación y análisis de imágenes (Uvitec, Cambridge, UK)

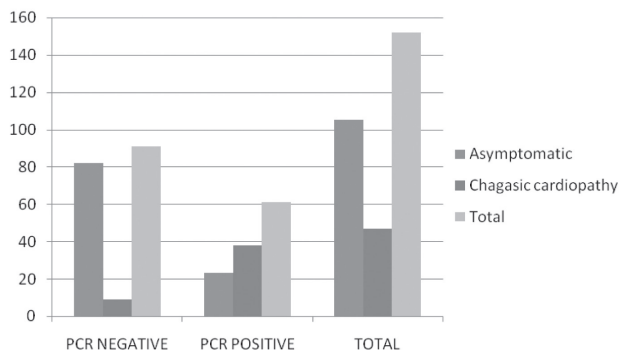
Un marcador de peso molecular fué usado como estándar de referencia para corregir las variaciones en las migraciones entre los diferentes geles.

El tamaño de los fragmentos fué calculado usando UVIssoft analysis software. Se construyó una matriz de 0 y 1 en base a la ausencia o presencia de bandas y finalmente el análisis de la distancia genética se realizó utilizando los programas Free Tree and TreeView con la opción Neighbour-Joining

RESULTADOS

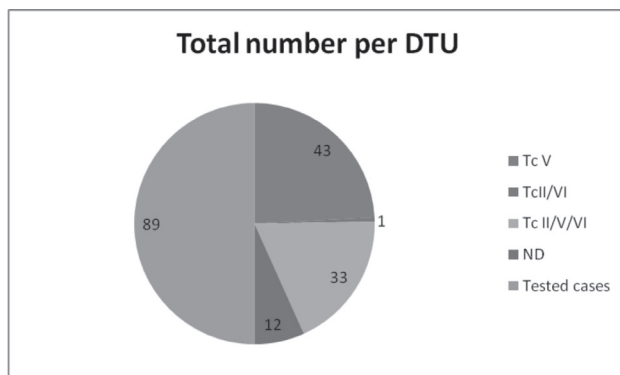
Los pacientes con compromiso cardíaco, presentaron una alta positividad de kDNA-PCR (χ^2 : 46,22, $p < 0.05$). (Figura 1)

Figura 1



La mayoría de las muestras Genotipificadas fueron clasificadas como de los grupos Tc V, or Tc II/V/VI (Figure 2). Además un caso de la localidad de “Las Hacheras” fué clasificada como grupo Tc II/VI. No fueron detectados *Trypanosoma cruzi* de los grupos I, III and IV. (Figura 2)

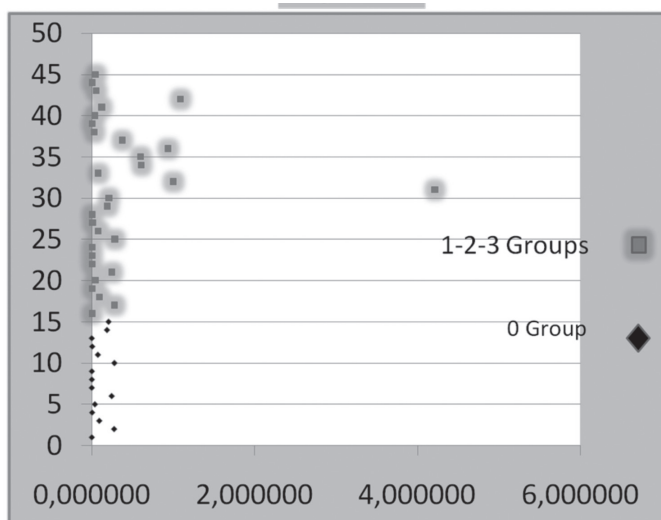
Figura 2



No se demostró asociación entre compromiso cardíaco y algún UDTs en particular

La técnica de Multiplex Real Time PCR permitió la cuantificación de los casos kDNA PCR positivos. Las cargas parasitarias fueron significativamente mayor en los grupos de cardiopatas según la clasificación de Kuschnir (grupos 1, 2 y 3) 0229.(Figura 3)

Figura 3



Se constató una alta seroprevalencia en la mayoría de las localidades estudiadas. y particularmente en aquellas más aisladas geográficamente de los centros urbanos tales como Colonia Aborigen, Miraflores, Las Hacheras y Nueva Pompeya (Tabla 1). Una excepción fué la comunidad Qom del barrio Mapic muy próximo a la capital de la provincial.

Tabla 1

Locality / ethnia	Sub-jects	Ethary Groups Age (years) Pediatric/ Adults	Seropositive cases N (%) Pediatric/ Adults	PCR positive cases N (%) Pediatric/ Adults
E. del Campo/ Pilagas	53	15-67	25 (47,2)	9 (36)
El Potrillo/ Qom	22	6-59	6 (27,3)	2(33)
Mapic/ Qom	108	1-60	4(3,7)	2(50)
Cnia. Aborígen/ Qom	35	1-55	19 (54,3)	15 (79)*
V. Berthet/ Mocoví	115	1-62	52 (45,2)	18 (34,6)
Miraflores/ Qom-Wichi	46	17-78	24 (52,2)	14 (58,3)
Las Hacheras/ Qom	60	20-76	34 (56,7)	22 (64,7)
Nueva Pompeya/ Wichi	55	28-60	30 (54,5)	10 (33,3)
Total	494		194 (39,3)	92(47,4)

DISCUSIÓN

Las provincias de Chaco y Formosa, en el noreste argentino, como también las regiones del sudoeste de Paraguay y sudeste de Bolivia, son caracterizadas como áreas con transmisión vectorial confirmada por la persistente notificación de casos de Enfermedad de Chagas Agudo. En un reporte de Panamerican Health Association (PAHO, 2008), la región del Gran Chaco Americano es caracterizada como un área donde el impacto de las acciones de control de infestación son contrarrestadas por las características eco-epidemiológicas. La enorme extensión territorial, junto con la inaccesibilidad y la baja densidad poblacional, hacen muy difícil cualquier tarea sostenida en ese sentido.

Además el control de la transmisión sostenible a largo plazo es factible a través de estrategias integradas y multifacéticas (Gürtler et al. 2007). Los programas de control del vector deben ser reforzados en varias dimensiones (staff, vehículos, etc) y deben ser provistos con tecnología de recolección de información y entrenamiento en el manejo de análisis e interpretación de datos. (Gurtler, 2009).

Por otro lado, el mejoramiento de las viviendas rurales debería proveer a sus habitantes domicilios menos susceptibles a la colonización por triatomíneos como es el caso del Barrio Mapic aquí estudiado.

Distribución de las Unidades de Tipificación Discreta de *Trypanosoma cruzi*:

Nuestros hallazgos en población originaria, son coincidentes con reportes de población general infectada en la region de América del Sur.

Además, Tc V fué reportado en Argentina, Bolivia y Paraguay, mientras que Tc VI fué también reportado en el Gran Chaco ([Chapman et al., 1984], [Zingales et al., 1999], [Brenière et al., 2002], [Diosque et al., 2003], [Higo et al., 2004], [Coronado et al., 2006], [Burgos et al., 2007], [Cardinal et al., 2008], [Carranza et al., 2009] and [Del Puerto et al., 2010]; Cura et al., 2012). Tc II ha sido rara vez reportado en Argentina y predomina en la zona central y este de Brasil (Zingales et al, 2012), se podría presumir entonces que las poblaciones de parásitos Tc II/VI de pacientes de la comunidad Wichi de Las Hacheras corresponden a Tc VI.

Tc I y Tc III, fueron anteriormente descriptos en el ciclo doméstico del Norte de Argentina, y no fueron detectados en nuestro lote de pacientes, aunque *T. c* I ha sido previamente identificado en pacientes de la region del Gran Chaco (Burgos et al., 2010; Cura et al, 2012;; Diosque et al, 2003). Vale la pena destacar que además TcI está más relacionado a la enfermedad humana en las regiones de Amazonia, y región Andina, en América Central y México (Bosseno et al., 2002], Montilla et al., 2002], Añez et al., 2004], Higo et al., 2004] , Sánchez-Guillén et al., 2006)). Hallazgos recientes en pacientes crónicos de Argentina, quienes sufrieron reactivación Chagásica debido a trasplantes cardíacos, permitieron identificar cepas de Tc I, detectadas sólo después de la terapia inmunosupresora, mientras que éstas mismas muestras antes del trasplante habían sido kDNA PCR negativas (Burgos et al, 2010). Esto sugeriría que éstas cepas Tc I podrían circular a bajas cargas parasitarias probablemente relacionado a su alto tropismo tisular cardiac. En este contexto, Tc I podría estar presente entre nuestros pacientes con hallazgos kDNA PCR negativos.

Cargas Parasitarias:

El mayor hallazgo del presente estudio es la correlación demostrada entre los diferentes Grupos Kuschner y los valores de cargas parasitarias como también con la positividad de kDNA-PCR.

Es válido especular entonces que las altas cargas parasitarias y consecuentemente las altas tasas de positividad de PCR, están relacionadas con un alto riesgo de reinfecciones. Esto a su vez está soportado por los porcentajes de infección registrados en los ejemplares de *Triatomas* infestans capturados que fué de 64% (n:328).

Estas evidencias revelan una seria situación de endemidad de la infección por *T. cruzi* en las regiones estudiadas y altas prevalencias entre poblaciones originarias.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi infection was addressed in 494 individuals from aboriginal communities of eight localities in Northeastern Argentina, belonging to the ethnias Qom, Wichí, Mocoit and Pilagá. Seroprevalences of *Trypanosoma cruzi* infection ranged from 3.7 to 56.7% in the different localities, being particularly higher in those communities more isolated from urban centers.

Polymerase chain reaction allowed bloodstream amplification of parasitic minicircle DNA (kDNA) in 46.5% of 194 seropositive cases. Parasitic loads measured by TaqMan-based Real Time PCR was significantly higher in Chagasic Cardiopathic Group (Kuschnir Groups 1-2-3) than Asymptomatic Group (Kuschnir 0) $p=0.0229$.

Parasite discrete typing units were directly identified in 86.5% of 89 kDNA-PCR positive blood samples using an algorithm based on the amplification of nuclear markers, being Tc V the prevailing genotype, in accordance with DTU distribution in the general *T. cruzi* infected population from Northern Argentina. It was noteworthy to detect an association between Kdna pcr positivity, parasitic load and cardiac involvement. Our findings reveal a serious situation related to the high endemity of *T. cruzi* infection in this area of the Gran Chaco Region, with persistent infection among aboriginal populations and suggest that severity of cardiac involvement is related to the possibility of persistent risk of re-infections.

Keywords: Chagas heart disease, *Trypanosoma cruzi*, Real time PCR, Discrete typing unit, Indigenous groups

BIBLIOGRAFÍA

1. Lucero RH, Brusés BL, Merino DE, Fernández GJ, Crenna EC, Alonso JM. Enfermedad de Chagas Congénito en Hospitales de la ciudad de Corrientes-Argentina. *Enf Emerg* 2007;9(3):121-124
2. Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 2000; 30:35-44.
3. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, et al. A new consensus for *Trypanoso-*

- ma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz **2009**; 104:1051–1054.
4. Macedo AM, Machado CR, Oliveira R, Pena SDJ. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz **2004**; 99: 1–12.
 5. Campbell DA, Westenberg SJ, Sturm NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. Curr Mol Med **2004**; 4:549–562.
 6. Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, et al. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. Int J Parasitol **2008**; 38:1533–1543.
 7. Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing Congenital Chagas disease. Int J Parasitol **2007**; 37:1319–1327.
 8. Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. Int J Parasitol **2005**; 35:411–417.
 9. Macedo, AM, Pena, SDJ. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitol Today **1998**; 14: 119–123.
 10. Burgos, JM, Begher, SB, Freitas, JM et al. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. Am J Trop Med Hyg. **2005**; 73(6):1016–8.
 11. Burgos, JM, Altcheh, J, Bisio, M et al. Direct molecular characterization of bloodstream parasite populations causing Congenital Chagas disease. Int. J. Parasitol, **2007**; 37(12):1319–27.
 12. Burgos, JM, Diez, M, Vigliano, C et al. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. Clin Infect Dis, **2010**; 51(5):485–95.
 13. Bisio M, Cura C, Duffy T, Altcheh J et al. *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients with HIV co-infection. Rev Biomed, **2009**; 20, 166–178.
 14. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infection, Genetics and Evolution 12 (2012) 240–253.
 15. Gürtler, R. E. Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco. Region: current challenges and possible approaches. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 July; 104(Suppl 1): 52–59.
 16. Storino R, Auger S, Caravello O, Urrutia MI, Sanmartino M, Jörg M. Cardiopatía chagásica en pacientes de área endémica versus contagiados en forma ocasional. Rev Saúde Pública 2002;36(6):755–8.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR TEMPRANO DE GENOTIPOS CARCINOGENÉTICOS DE *HELICOBACTER PYLORI* EN MUESTRAS DE BIOPSIAS GÁSTRICAS EN POBLACIÓN INFANTIL

Marcelo G. Medina, Patricia Motta, Luis Antonio Merino, María de los
angeles López, Noelia Pegoraro, Myriam L. Medina.
Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Av. Las Heras
727, Resistencia, Chaco.
E-mail.drmarcelomedina@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La importancia de *Helicobacter pylori* en las enfermedades gastroduodenales no fue entendida sino hasta que esta bacteria se descubrió accidentalmente por la incubación prolongada de un cultivo puro de una biopsia de la mucosa gástrica por Barry J. Marshall y J. Robin Warren, en 1983.¹

H. pylori es una bacteria patógena que infecta el estómago, por lo que es reconocida como el agente causal de la gastritis crónica activa, es el principal factor de riesgo para desarrollo de úlcera gástrica y duodenal y está relacionada con el desarrollo de cáncer gástrico.¹ La prevalencia de la infección por *H. pylori* presenta una distribución diferente en el ámbito mundial, llegando hasta 50% en los países desarrollados y más de 80% en los países en vías de desarrollo. En países en desarrollo *H. pylori* se adquiere principalmente en la infancia antes de los diez años, por lo que el 80% de la población adulta se encuentra infectada por esta bacteria. Los cambios inflamatorios asociados a la infección con *H. pylori* progresan durante toda la vida del individuo. Sin embargo, la manifestación de enfermedad casi siempre se presenta en la edad adulta.² La alta prevalencia de la infección a nivel mundial ha estimulado el desarrollo de varios métodos para el diagnóstico de la infección de *Helicobacter pylori*³. La biopsia es útil para hacer improntas teñidas con el fin de buscar a la bacteria, los cortes histológicos apoyan al diagnóstico anatomopatológico³. La zona de elección sugerida para la toma de biopsia gástrica es la zona del antro tomada mediante panendoscopia. Su cultivo es difícil dadas las condiciones nutricionales exigentes; sin embargo, es indispensable la recuperación de la bacteria porque confirma el diagnóstico y permite realizar las pruebas de identificación, genotipificación, ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos, determinar factores de virulencia

y diversidad genética a partir de las bacterias recuperadas de la muestra, esto permite hacer estudios de reinfecciones y recurrencias de la infección³. El cultivo de aislamientos clínicos de *H. pylori* es un procedimiento largo y costoso ya que, se requiere de biopsias frescas de mucosa gástrica. Esto ha motivado la búsqueda de métodos alternativos que permitan la caracterización de factores de virulencia con la posibilidad de llevar a cabo, la tipificación de un gran número de cepas con fines epidemiológicos³. La infección por *H. pylori* en el huésped desarrolla una respuesta inmune que es inefectiva para eliminar a la bacteria, pero juega un papel fundamental en la evolución de la infección hacia las distintas formas clínicas que son tan variadas como la gastritis superficial leve, úlcera duodenal o cáncer gástrico³.

En la evolución de la infección influyen factores de la bacteria, del hospedero y ambientales; 60-80% de las cepas de *H. pylori* tienen el gen *cagA* que se encuentra en una isla de patogenicidad llamada *cag* PAI. La proteína Cag A es considerada como un marcador de patogenicidad, ya que su presencia se relaciona con el desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico⁴. A pesar de su importancia en la evolución de la infección por *H. pylori*, muy pocos estudios han evaluado la respuesta inmune a los factores de virulencia como CagA y ureasa en niños y adultos infectados con el bacilo³. En un estudio donde se estudiaron sueros de 645 pacientes, incluyendo 352 niños y 293 adultos. La infección por *H. pylori* se detectó por serología en 130 niños (36.9%); entre los infectados, 61 (46.9%) tenían anticuerpos IgG contra CagA y 21 (16.2%) tenían anticuerpos contra ureasa. Entre los adultos, 261 (89.1%) de 293 estaban infectados con el bacilo: de éstos, 206 (78.9%) tenían anticuerpos contra CagA y 154 (59%) tenían anticuerpos contra ureasa. La magnitud de la respuesta de IgG a CagA y ureasa fue diferente en los niños que en los adultos estudiados. Los adultos mostraron una respuesta anti-CagA significativamente mayor y hubo una respuesta de IgG a ureasa significativamente menor que en los adultos. La cinética de la respuesta serológica a CagA y ureasa a través de la edad fue estadísticamente significativa entre ambos grupos⁵.

Múltiples genes que están contenidos en la isla *cag* PAI, parecen estar involucrados en estimular la respuesta epitelial de IL-8 después de la adhesión de *H. pylori*⁴. *H. pylori* muestra diversidad genética, atribuida a la deriva génica y a la transferencia horizontal de genes. Durante el largo tiempo de colonización puede haber infección por poblaciones bacterianas genética y fenotípicamente heterogéneas. Hay secuencias únicas que son producto de frecuencias de recombinación elevadas, en ausencia de mecanismos efecti-

vos para seleccionar a la población de cepas recombinantes. *H. pylori* presenta población panmítica en equilibrio que se selecciona y exhibe cambios entre aislados clínicos, que se producen por la recombinación e intercambio horizontal de genes. Las infecciones mixtas pueden ser sólo transitorias, con múltiples cepas de *H. pylori*, con intercambios genéticos frecuentes⁶. La diversidad de secuencias en *H. pylori* puede reflejar una alta tasa de mutaciones debido posiblemente a “fenotipos mutadores” causados por baja actividad o falta de genes involucrados en la reparación de DNA, como se ha observado en otras especies. La naturaleza no clonal de *H. pylori* favorece que los distintos aislados puedan ser identificados usando técnicas de “huella genética” de DNA⁶. En infección crónica hay transferencia horizontal de genes; estos eventos en *H. pylori* revelan que aunque su huella genética puede ser semejante a la cepa que se adquirió en la infancia, tienen acumulada mucha variabilidad genética que puede ser detectada empleando técnicas de diversidad⁶. La técnica de RAPD-PCR puede distinguir entre cepas de diferentes individuos, así como entre cepas del mismo paciente⁶. Las cepas con genes *vacA*, *cagA* y *babA* se usan para definir los polimorfismos, tienen una distribución geográfica particular y presentan huellas genéticas que distinguen a las cepas de *H. pylori* en “Asiáticas” y “No asiáticas”⁶. La separación geográfica puede ser el resultado de polimorfismos de genes asociados a virulencia y la fijación de mutaciones en distintas áreas^{6,7}. Cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes de México, dieron un mayor porcentaje de polimorfismo en los tres genes asociados a virulencia, *cagA*, *babA* y *oipA* que el observado en otras cepas de origen occidental. La caracterización molecular de *Helicobacter pylori* como una medida preventiva para el desarrollo de cáncer gástrico. *H. pylori* constituye un importante problema de salud pública, en la última década, se han desarrollado técnicas moleculares de valor diagnóstico y epidemiológico, que han permitido implementar mejores terapias de erradicación, así como conocer mejor a la bacteria. Esto llevó a muchos investigadores a estudiar los aspectos genéticos de la isla de patogenicidad *cagA*+ (*cag* PAI) de *H. pylori* que es uno de los factores de virulencia más importantes de este microorganismo. *cag* PAI contribuye a producir inflamación y daño de la mucosa gástrica, al inducir la secreción de IL-8, además tiene la característica de experimentar inserciones, eliminaciones y rearrreglos genéticos que han llevado a la generación de cepas de *H. pylori* con diferentes grados de virulencia, que determinan el grado de deterioro del epitelio gástrico y como consecuencia, la evolución de la infección. La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) está siendo utilizada como un

método de diagnóstico para la tipificación del gen *vacA* y para determinar la presencia del gen *cagA*. *vacA* y *babA*² de cepas de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas⁷. En Brasil, Gatti y col estudiaron a 121 niños buscando establecer alguna relación entre la presencia de la infección por el genotipo *cagA* de *Helicobacter pylori* y el grado de infiltración inflamatoria en la mucosa gástrica. Del total de niños evaluados, el 47% (n=57) presentó infección por *Helicobacter pylori*, 29 presentaron gastritis crónica y 28 una mucosa gástrica normal al examen histopatológico. La presencia del genotipo *cagA* fue mayor en los pacientes con gastritis crónica (69%) que en los pacientes con mucosa gástrica normal (64%), demostrando la fuerte asociación existente entre el genotipo *cagA* y el grado de respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica⁸. Martins y col analizaron la expresión de los genes *cagA* y *vacA* de *Helicobacter pylori* en 129 pacientes (69 con gastritis y 60 con enfermedad úlcero-péptica) y su correlación histopatológica. El genotipo *vacA* fue observado en el 96.6% de los casos infectados con *Helicobacter pylori*, siendo el alelo s1m1 el más prevalente. El genotipo *cagA* fue detectado en el 78% de los pacientes infectados con *Helicobacter pylori* y su expresión estuvo asociada con el genotipo *vacA* s1m1. Las cepas *cagA* +/- *vacA* + s1m1 fueron asociadas con un incremento en el riesgo de enfermedad úlcero-péptica, mayor infiltración linfocítica y neutrofílica en la mucosa gástrica y mayor presencia de metaplasia intestinal.⁸ Leite y col evaluaron mediante la técnica de PCR la expresión del genotipo *cagA* de *Helicobacter pylori* y su relación con los hallazgos histopatológicos, así como también el grado de apoptosis y proliferación celular en 164 muestras de biopsias gástricas. Se detectó la presencia de la bacteria en 67.7% de las muestras, observándose una relación entre la presencia de la bacteria y el diagnóstico de gastritis moderada o severa, úlcera y linfoma tipo MALT. La expresión del genotipo *cagA* fue asociada con un riesgo relativo mayor (8.8) de presentar patología gástrica severa, incluyendo enfermedad úlcero-péptica, adenocarcinoma gástrico o linfoma tipo MALT. También hubo correlación entre la expresión de este genotipo y la tasa de proliferación y apoptosis en el tejido gástrico de los pacientes infectados⁹. Thomazini y col valoraron mediante la técnica de PCR la frecuencia de expresión de los genotipos *cagA* y *vacA* de la bacteria *Helicobacter pylori* en 42 pacientes con cáncer gástrico. En el 95% de los pacientes se demostró la presencia de la bacteria, de los cuales el 54.7% presentaron el genotipo *cagA*. Los diferentes alelos del genotipo *vacA* mostraron estas frecuencias: s1 57.1%; m1 61.9%; s2 9.5% y m2 7.1%. Estos resultados confirman la importancia de la expresión de ambos genotipos del *Helicobacter*

pylori en la patogénesis de lesiones gástricas significativas como el cáncer gástrico¹⁰. En Chile, Araya y col investigaron la relación entre la prevalencia de los genotipos bacterianos *cagA*, *vacA* e *iceA* del *Helicobacter pylori* y su relación con la forma e intensidad de la gastritis en población adulta portadora de patología gástrica benigna. De 64 casos estudiados, en 53 se demostró la infección por *Helicobacter pylori*. En estos pacientes, la presencia del genotipo *cagA* o los alelos *s1m1* y *s2m2* del genotipo *vacA* se correlacionó directamente con la severidad del daño epitelial y la infiltración con polimorfonucleares. El alelo *s2m2* del genotipo *vacA* fue asociado a daño leve o ausente de la mucosa gástrica. Por otro lado, no se encontró asociación entre el genotipo *ice* y las características patológicas de la gastritis¹⁰. En Colombia, Quiroga y col investigaron la frecuencia de los genotipos *cagA*, *vacA*, *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en 166 pacientes con enfermedad gastroduodenal (50 con úlcera péptica, 39 con gastritis crónica no atrófica, 26 con gastritis crónica atrófica, 26 con metaplasia intestinal y 25 con adenocarcinoma gástrico) buscando la presencia de alguna relación entre los diferentes genotipos mencionados y las diferentes consecuencias clínicas de la infección. Se observó una mayor frecuencia de cepas citotóxicas (*vacAs1m1/cagA+/cagE+*) en pacientes con cáncer (84%), metaplasia (91%) y úlcera (81%) en comparación con pacientes con gastritis no atrófica (50%). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de los genotipos *oipA* y *babA2*, y las diferentes enfermedades gastroduodenales, por lo que no hubo evidencia de que los genotipos *babA2* y *oipA* puedan servir como marcadores de ulcerogénesis o carcinogénesis en esta población estudiada¹¹. En Perú, Guerrero Alva y col evaluaron la asociación entre la expresión de proteínas celulares asociadas a carcinogénesis (P53, Bcl-2, PCNA) y la presencia de *Helicobacter pylori* con el grado histológico de la neoplasia gástrica. Evaluaron 83 biopsias gástricas: 48 carcinomas de células en anillo de sello (Cde CAS), 21 adenocarcinomas tubulares y papilares (ATP), 5 displasias y 9 gastritis, observando las siguientes frecuencias: P53 (94% en Cde CAS, 95% en ATP, 40% en displasias, 100% en gastritis); Bcl2 (48% en C de CAS, 71% en ATP, 80% en displasias, 100% en gastritis); PCNA (46% en C de CAS, 22% en gastritis), *Helicobacter pylori* (42% en C de CAS, 43% en ATP, 20% en displasias, 100% en gastritis). El *Helicobacter pylori*, detectado mayormente en gastritis, parecería jugar su rol más importante en los pasos iniciales de la inflamación crónica de la mucosa¹¹.

En este trabajo concordamos con otros autores, en el sentido de que los estudios de genotipificación son importantes⁷. El principal objetivo de este

estudio, consistió en identificar a los elementos genéticos que convierten a *H. pylori* en un agente carcinogénico mediante la tipificación de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con patología gastrointestinal; con la finalidad de identificar un marcador temprano de dicha enfermedad que pueda ser utilizado como método de diagnóstico predictivo y preventivo.

OBJETIVOS

Objetivo general.

–Detección molecular precoz de genotipos carcinogénicos de *Helicobacter pylori* en muestras de biopsias gástricas en población pediátrica.

Objetivos específicos.

±Detectar la presencia de *Helicobacter pylori* en muestras de biopsias gástricas en una población pediátrica a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

–Caracterizar y detectar por primera vez en esta Región del país los genotipos específicos *cagA*, *vacA*, *babA*² que presentan mayor potencial carcinogénico en niños.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño.

Se realizó un estudio descriptivo prospectivo y transversal.

Población y muestra.

Población:

Universo o población objetivo;

El universo estuvo integrado por todos los pacientes dispépticos que concurrieron al Servicio de Gastroenterología del Hospital Pediátrico "Dr. Avelino Castelán", de Resistencia, Chaco.

Unidad de análisis, criterios de inclusión y exclusión;

La unidad de análisis estuvo conformada por aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. La muestra estuvo formada por 62 pacientes pertenecientes al mencionado universo.

Criterios de Inclusión:

Se seleccionaron todos los pacientes dispépticos con edades comprendidas entre 1 y 14 años.

Criterios de Exclusión:

Se excluyeron del presente estudio aquellos pacientes que hubiesen recibido antibióticos, inhibidores de los receptores H2 o antiácidos.

Población accesible: Muestra. Selección y tamaño de la muestra. Análisis de sesgos.

Pacientes accesible: Pacientes dispépticos que concurren al Servicio de Gastroenterología del Hospital Pediátrico "Dr. Avelino Castelán", de Resistencia, Chaco.

La muestra estuvo formada por 62 pacientes pertenecientes al mencionado universo.

El tamaño muestral se definió en base al número de pacientes dispépticos atendidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Pediátrico "Dr. Avelino Castelán" durante el período de 2 años (4000 aprox.) y la prevalencia de *H. pylori*, hallada a través de trabajos previos y en la literatura.^{5,6,7}

El tipo de muestreo será no probabilístico del tipo intencional o por conveniencia, teniendo en cuenta en que solo serán seleccionados aquellos pacientes que de acuerdo a la opinión de los especialistas reúnan los criterios de inclusión

VARIABLES.

- En la dispepsia (variable independiente) fueron considerados los genotipos de *H. pylori* como (variables dependientes).
- En las enfermedades gastrointestinales (variables independientes) fueron considerados los genotipos de *H. pylori* como (variables dependientes).
- También se registraron como variables independientes: edad y sexo.

Se consideró dispepsia: al síntoma o conjunto de síntomas que tenga su origen en la región gastroduodenal siendo estos síntomas; la pesadez pos-

tprendial y el dolor o ardor epigástrico, debiendo haber aparecido al menos 6 meses antes y estar activos durante 3 meses.

- Las gastropatías que se consideraron fueron todas aquellas enfermedades gástricas que sean reconocidas como tales mediante la anatomía patológica.
- Las enfermedades gingivoperiodontales que se tuvieron en cuenta fueron clasificadas como: Gastritis: a la inflamación de la mucosa gástrica, que en la gastroscopía se ve enrojecida, presentándose en diversas formas. Úlcera péptica: Una úlcera es toda lesión de la piel o membrana mucosa con forma crateriforme (forma de un cráter, al perderse parte del tejido) y con escasa o nula tendencia a la cicatrización.

Una úlcera péptica es aquella que afecta la mucosa que recubre el estómago o el duodeno (la primera parte del intestino delgado). Se clasifican en úlceras gástricas y úlceras duodenales, estas últimas son mucho más frecuentes. Las úlceras pépticas pueden aparecer tanto en las mujeres como a los hombres desde la infancia hasta edades avanzadas

Los genotipos de *H. pylori* que se tipificaron fueron: cag A, vac A, bab A.

Para medir las variables consideradas en este estudio se emplearon las siguientes escalas de medidas:

Escala nominal: Para sexo, tipo de patología gástrica y tipo de enfermedad gastrointestinal y tipo de genotipos (asignando un número a cada tipo.)

Escala de razón: Para tipo de patología gástrica y tipo de enfermedad gastroduodenal y tipo de genotipos (para determinar prevalencia en porcentajes).

INSTRUMENTOS O TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Estructura y diseño del instrumento:

Fichas Personales: Se confeccionaron las mismas en las que se describieron los datos filiatorios y se hizo hincapié en los hábitos higiénicos, condiciones socio-económicas, patologías gastrointestinales, manifestaciones clínicas, etc.

Muestras de biopsia endoscópica gástrica:

- Identificación y Extracción de ADN: Las biopsias gástricas fueron macedradas y homogenizadas en buffer de extracción a 55°C por 3 horas. Luego se realizó la extracción fenólica del ADN de *H. pylori*. El ADN se extrajo de acuerdo al método descrito por Mazurier y col, a partir de una suspensión en buffer, posteriormente se suspendió en agua destilada estéril libre de nucleasas y se procesó de inmediato o se almacenó a -20°C hasta su uso.
- Genotipificación: de las cepas de *H. pylori* por PCR simple para los genes *cagA*, *vacA* y *babA2*. Las secuencias de los partidores y las condiciones de amplificación fueron las utilizadas previamente por Chang y Cols. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,7% (p/v) seguido de tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y visualización mediante transiluminador UV.

Plan de análisis de los resultados

El análisis los datos recolectados fueron realizados en el 9° y 10° meses del primer año de estudio. Luego de este análisis se realizó la devolución de los mismos a las autoridades y responsables del servicio de gastroenterología y a partir de allí en los dos últimos meses del proyecto se trabajó en la difusión de la información y el diseño de las estrategias para trabajar sobre dichos resultados con la finalidad de intervenir en la detección, tratamiento y seguimiento de los casos.

Se aplicaron métodos e instrumentos y procedimientos de acuerdo al siguiente detalle:

Revisión de los datos obtenidos, elaboración de una base de datos, tabulación y representación gráfica.

Para las variables cualitativas se utilizó el porcentaje para la frecuencia de medidas relativas. Para las medidas de tendencia central se utilizaron la media, mediana y moda.

Para el estudio de asociación entre variables cualitativas se aplicó la técnica de chi cuadrado fijándose el nivel de significancia estadística en el 95%.

Los datos obtenidos fueron procesados mediante el programa Epi Info V.6.0.

RESULTADOS

La pesquisa de genes de virulencia en aislados clínicos de *H. pylori*, en población pediátrica, constituye una herramienta importante para caracterizar y detectar cepas específicas que presentan mayor potencial patogénico. Del total de 62 pacientes pediátricos con patologías gastroduodenales, cuya edad promedio fue de 6 años (1 a 14 años de edad), se detectó por biología molecular *Helicobacter pylori* en 17 muestras y del análisis de los amplicones *cagA*, *vacA*, se detectó el gen *cagA* en 53% de los aislados clínicos analizados (9/17), en tanto que el gen *vacA* se detectó en 70,60% (12/17) de las muestras. No se halló en nuestra población el gen *babA2*, el cual codifica para la proteína BabA, que se ha asociado con mayor adherencia y patologías más severas. Por otra parte, se observó amplificación simultánea de los genes *CagA* y *vacA* en 9/17 aislados clínicos de las muestras de biopsia gástrica, indicativo de la presencia de más de un genotipo en la muestra de biopsia del paciente.

DISCUSIÓN

En nuestro trabajo de investigación logro detectar los genotipos carcinogénicos de *Helicobacter pylori* en muestras de biopsias gástricas en población infantil, estos genes están asociados con patologías gastroduodenales severas¹². Es conocido que *Helicobacter pylori* es un patógeno gástrico que crónicamente infecta a más de la mitad de todas las personas en todo el mundo. En los países en desarrollo, 70-90% de la población lleva *H. pylori*; casi todos estos adquieren la infección antes de la edad de 10 años¹³. Coincidiendo estos datos con nuestro hallazgo de *H. pylori* en nuestra población infantil. Por lo tanto, *H. pylori* en los países en desarrollo pueden contribuir a la malnutrición infantil y aumentar el riesgo o la gravedad de la infección por otros agentes patógenos gastrointestinales¹⁴. Muchos estudios de poblaciones de oriente y occidente señalan que los factores de virulencia de *H. pylori* varían de acuerdo a la localidad geográfica y a la edad del individuo¹⁵. Así, se ha demostrado que los factores de virulencia difieren en las cepas obtenidas de diferentes poblaciones¹⁶. Las muestras de las biopsias gástricas incluidas en este estudio, tuvieron la prevalencia del genotipo *vacA*, seguido por el genotipo *cagA* en los aislados clínicos. Resultados similares se observaron en otros estudios realizados en países limítrofes¹⁷. No se halló el genotipo *babA2*, en nuestra población.

Los resultados obtenidos también muestran que se aisló un perfil genético relacionado con cepas ulcerogénicas (*cagA*+, *vacA*) y con un perfil genético presente en cepas asociadas a metaplasia o adenocarcinoma gástrico¹; lo cual coincide con lo descrito por otros autores. Este estudio de genotipificación de cepas de *H. pylori* en este grupo de pacientes han mostrado que la presencia del gen *cagA* o de la *vacA*, no tendrían un valor predictivo de riesgo de patologías gástricas severas. Sin embargo, cuando la cepa presenta el genotipo *cagA*+/*vacA*, habría un mayor riesgo de desarrollar enfermedad péptica ulcerosa¹⁸, así también lo describen otros autores. Así, los resultados presentados sugieren la existencia de un porcentaje significativo de pacientes en esta región del país, con riesgo potencial de adquirir enfermedad péptica ulcerosa en base a los genotipos de *H. pylori*. Por otra parte, la presencia del gen *cagA* o del gen *vacA*, se correlaciona directamente con la infiltración por neutrófilos, con la severidad del daño epitelial, y se asocia en forma significativa con daño ligero de la mucosa o ausencia de daño. Otros autores coinciden con estos hallazgos.

La no detección del gen *babA2* en este estudio sugiere que *babA2* podría ser un marcador útil para predecir riesgo de adquirir enfermedades gástricas severas asociadas a *H. pylori*¹⁹, como se ha señalado en la literatura para algunos países, ya que en nuestra población, *cagA* y *vacA* por sí solos no se asociarían con daño gástrico severo; tal como ocurre en otras poblaciones²⁰.

Finalmente, los resultados, en su conjunto, indican que las cepas de *H. pylori* aisladas en nuestros pacientes pediátricos con alguna patología gastroduodenal, tendrían un considerable potencial patogénico y debiera incluirse en los estudios la detección por biología molecular de los genotipos de *H. pylori* en busca de cepas con mayor virulencia. La ausencia del gen *babA2* puede ser sugerente de su importancia como marcador específico para cepas de mayor capacidad adherente y con mayor potencial patogénico.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

H. pylori: *Helicobacter pylori*.

RESUMEN

Introducción: La infección con *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) está asociada con el desarrollo de diferentes enfermedades gastroduodenales. Varios genes de virulencia de *H. pylori* se han relacionado con mayor riesgo de enfermedad gástrica. Los 3 principales factores de virulencia son la toxina vacuolizante (*VacA*), el gen de la citotoxina asociada al producto (*CagA*) y la proteína de adhesión (*babA2*). Debido a la diversidad geográfica de prevalencia de *H. pylori* y sus factores de virulencia, el objetivo de este trabajo fue detectar uno de los genotipos de *H. pylori* en muestras de biopsia gástrica en una población pediátrica, a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Métodos: *H. pylori* fue identificado en muestras de biopsias gástricas por PCR de pacientes con dispepsia y criterios de endoscopia gástrica. El gen *vacA* fue detectado por PCR multiplex.

Resultados: Por biología molecular *H. pylori* positivos fueron 17 (27,42%). Las cepas de *H. pylori* que fueron positivas para el gen *vacA* 70,60% y para el gen *cagA* el 53% de las muestras. No se halló el gen *babA*.

Conclusión: las cepas de *H. pylori* aisladas en nuestros pacientes pediátricos con patología gastroduodenal, tendrían un considerable potencial patogénico y debiera incluirse en los estudios la detección por biología molecular de los genotipos de *H. pylori* en busca de cepas con mayor virulencia. La ausencia del gen *babA2* puede ser sugerente de su importancia como marcador específico para cepas de mayor capacidad adherente y con mayor potencial patogénico.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, genotipificación, pediátrico.

ABSTRACT

Introduction: Infection with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is associated with the development of different gastrointestinal diseases. Several virulence genes of *H. pylori* have been linked to increased risk of gastric disease. The 3 major virulence factors are toxin vacuolating (*VacA*), cytotoxin-associated gene to the product (*CagA*) and protein adhesion (*babA2*). Due to the geographical diversity of prevalence of *H. pylori* and its virulence factors, the objective of this study was to detect one of the genotypes of *H. pylori* in gastric biopsies in a pediatric population, through chain reaction (PCR).

Methods: *H. pylori* was identified in gastric biopsy specimens by PCR in patients with dyspepsia and gastric endoscopy criteria. The *vacA*, *cagA*, *babA* genes were detected by multiplex PCR.

Results: For molecular biology *H. pylori* positive were 17 (27.42%). Strains of *H. pylori* were positive for the gene *vacA* 70.60% and for the *cagA* gene, 53% of the samples. There was not *babA* gene.

Conclusion: *H. pylori* strains isolated in our pediatric patients with gastro-duodenal pathology, would have a significant pathogenic potential and should be included in studies by molecular detection of *H. pylori* genotypes for strains with increased virulence. The absence of *babA2* gene may be suggestive of its importance as a specific marker for adherent strains higher capacity and greater pathogenic potential.

Key words: *Helicobacter pylori*, genotypes, pediatrics

REFERENCIAS

1. Zambon CF, Navaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M. *Helicobacter pylori babA2*, *cagA*, and *s1vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol* 2003; 56: 287-91.
2. Marshall B. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 116-27.
3. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest.* 2004; 113: 321-333.
4. Lai C-H, Kuo C-H, Chen Y-C, Chao F-Y, Poon S-K, Chang C-S et al. High prevalence of *cagA* and *babA2* positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2002; 40: 3860-2.
5. Torres J, Camorlinga-Ponce M, Pérez-Pérez G, Muñoz L, Muñoz O. Specific serum immunoglobulin G response to urease and CagA antigens of *Helicobacter pylori* in infected children and adults in a country with high prevalence of infection. *Clin Diag Lab Immunol* 2002; 9: 97-100.
6. Akopyanz N, Bulkanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acid. Res.* 1992; 20(19): 5137-5142.
7. Van Doorn LJ, Henskens Y, Nouhan N, Verschuuren A, Vreede R, Herbrink P, Ponjee G, Van Krimpen K, Blankenburg R, Scherpenisse J, Quint W. The efficacy of laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy specimens is related to bacterial density and *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:13-17.
8. Martins LC, Corvelo TC, Demachki S, Araujo MT, Assumpção MB, Vilar SC, et. Al. Clinical and pathological importance of *vacA* allele heterogeneity and *cagA* status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100: 875-881.

9. Leite K, Darini E, Canavez F, Carvalho C, Mitteldorf C, Camara-Lopes LH. *Helicobacter pylori* and *cagA* gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsies: correlation with histological findings, proliferation and apoptosis. *Sao Paulo Med J* 2005;123:113-118.
10. Thomazini CM, Pinheiro NA, Pardini MI, Naresse LE, Marchesan RMA. Infecção por *Helicobacter pylori* e câncer gástrico: frequência de cepas patogênicas *cagA* e *VacA* em pacientes com câncer gástrico. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42: 25-30.
11. Quiroga AJ, Cittelly DM, Bravo MM. Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastro-duodenales. *Biomedica (Bogota)* 2005; 25:325-334.
12. Salgado F, García A, Oñate A, González C, Kawaguchi F. Increased *in-vitro* and *in-vivo* biological activity of lipopolysaccharide extracted from clinical low virulence *vacA* genotype *Helicobacter pylori* strains. *J Med Microbiol* 2002; 51: 771-6.
13. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:720-741.
14. Mukhopadhyay AK, Kersulyte D, Jeong JY, Datta S, Ito Y, Chowdhury A, Chowdhury S, Santra A, Bhattacharya SK, Azuma T, Nair GB, Berg DE. Distinctiveness of Genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta. *India J Bacteriol*. 2000;182:3219-3227. doi: 10.1128/JB.182.11.3219-3227.2000.
15. Podzorski R, Podzorski D, Wuertth A, Tolia V. Analysis of the *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patient from the Midwestern United States. *Diagnos Microbiol Infec Dis* 2003, 46: 83-8.
16. Yakoob J, Fan XG, Peng XN, Hu GL, Zhang Z. *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* cytotoxin genes in Changsha, China. *Br J Biomed Sci* 2002; 59: 150-3.
17. García CA, Barra TR, Delgado Sch C, Kawaguchi PF, Trabal FN, Montenegro HS et al. Genotipificación de aislados clínicos de *Helicobacter pylori* en base a genes asociados a virulencia *cagA*, *vacA* y *babA2*: Primer aislamiento de una cepa *babA2* positiva en pacientes chilenos. *Rev. méd. Chile* 2006; 134(8): 981-988.
18. Faúndez G, Troncoso M, Figueroa G. *cagA* and *vacA* in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer and non-ulcerative dyspepsia patients. *BMC Gastroenterol* 2002; 2: 20.
19. Yu J, Leung WK, Go MY, Cjhan MCW, To KF, Ng EKW et al. Relationship between *Helicobacter pylori babA2* status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut* 2002; 51: 480-4.
20. Araya J, Anabalón L, Roa I, Bravo M, Villaseca M, Guzmán P et al. Relación de la genotipificación de *Helicobacter pylori* con la forma e intensidad de la gastritis en población adulta portadora de patología gástrica benigna. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 1345-54.

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS PATOGENICOS EN ENDOMETRIOSIS COMO BASES PARA HALLAR NUEVOS ABORDAJES TERAPÉUTICOS

Carla Olivares, Juan I Bastón, Gabriela Meresman
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

La endometriosis se define por la presencia de focos de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. Afecta a aproximadamente un 10% de la población femenina en edad reproductiva, provocando dolor pélvico e infertilidad¹. Es sabido que la terapéutica que se les propone actualmente a las pacientes con endometriosis no es del todo efectiva ya que la infertilidad asociada a la patología no siempre es revertida y además, son habituales los casos de recidivas luego de la medicación supresora o de la terapia quirúrgica. Dada esta situación, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas más eficientes, y que acarreen menos efectos colaterales, es constante.

En los últimos años se ha descrito una serie de mecanismos interrelacionados que actúan a nivel del endometrio eutópico y ectópico en pacientes con endometriosis, y que finaliza con una producción estrogénica local incrementada. Existe un consenso generalizado sostenido por la contundencia de los hallazgos experimentales que indican que en las lesiones endometriósicas se observa una expresión y una actividad de aromatasa P450 aumentada, lo que estaría causando una producción local incrementada de estrógenos. Asimismo, se conoce una demostrada interacción entre aromatasa y la cascada prostaglandínica en las lesiones endometriósicas; los estrógenos estimulan la ciclo-oxigenasa-2 (COX-2), y por lo tanto incrementan la producción de prostaglandina E² (PGE²), reconocido mediador del proceso inflamatorio².

Los inhibidores de aromatasa (IAs) de última generación son drogas no esteroides con vida media relativamente corta y con efectos reversibles. El efecto que se busca al administrar este tipo de compuestos es reducir la producción de estrógenos y, de esta manera, intentar inhibir la proliferación celular para lograr disminuir el tamaño de las lesiones endometriósicas. Como ya se conoce, los estrógenos estimulan la actividad de COX-2, y los IAs inhibirían la producción de PGE² y ayudarían a combatir el dolor. Los IAs que se encuentran actualmente en el mercado, son los llamados IAs de

tercera generación³. Entre ellos los más utilizados son: exemestane, letrozole y anastrozole.

La posible aplicación de estos compuestos en la terapéutica de la endometriosis fue inicialmente descrita por Takayama y colaboradores⁴. Luego, experimentos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la utilización tanto de anastrozole como de letrozole en cultivos de células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis aumentaban los niveles de apoptosis y disminuían los de proliferación celular⁵. Resultados similares obtuvimos cuando utilizamos estos compuestos en el tratamiento de la endometriosis inducida en un modelo de ratón; la proliferación celular disminuyó, el número de células apoptóticas aumentó en las lesiones endometriósicas y los niveles de PGE en el líquido peritoneal de los ratones se vieron disminuidos⁶.

Por otro lado, COX-2 pertenece a la familia de las ciclooxigenasas, enzimas responsables de la producción de PG a partir de ácido araquidónico (AA). La enzima COX-2 es estimulada fisiológica y patológicamente por factores de crecimiento y citoquinas e interviene en la síntesis de PGs⁷.

Las PGs son lípidos bioactivos que poseen múltiples y variadas funciones (Figura 1). En biología reproductiva se ha encontrado que participan en la regulación de la ovulación, en la fisiología endometrial y en el proceso de menstruación⁸. Se ha visto que en procesos patológicos muchas veces la expresión de COX-2 se encuentra aumentada, como en distintos tipos de cáncer, donde su alta expresión correlaciona con un mal pronóstico para el paciente. Por otro lado en otros procesos inflamatorios, como en adenomiosis y endometriosis, también su expresión se ha hallado incrementada (9-11).

De manera similar al hallazgo de la expresión aumentada de aromataasa en endometriosis, el descubrimiento de la sobreexpresión de la enzima COX-2 en pacientes con la enfermedad respecto a mujeres controles, fue un hecho sumamente importante. La presencia de estas dos enzimas claves en la síntesis de estrógenos y de PGE² explica en gran parte el estado de activa proliferación de las lesiones endometriósicas y los fuertes dolores que experimentan las pacientes (12-15). Los altos niveles de PGs, no sólo favorecen la proliferación celular estimulando la actividad de aromataasa con su consiguiente producción de estrógenos, sino que además los mismos estrógenos, aumentan la síntesis de PGE² estimulando la actividad de COX-2 (16).

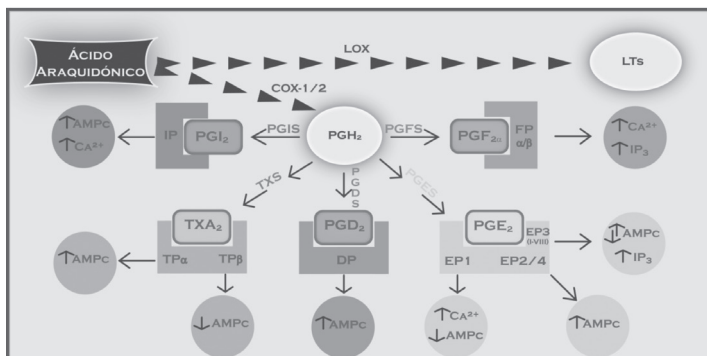


Figura 1 Esquema de la síntesis de prostaglandinas y sus vías de señalización. El ácido araquidónico es el precursor de la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas. Cada prostaglandina se une a un receptor de siete pasos transmembrana específico y dispara una cascada de señales característica. LOX: lipoxigenasa; LTs: leucotrienos; COX-1/2: ciclooxigenasa-1/2; PGI₂: prostaciclina; PGIS: sintetasa de prostaciclina; TXA₂: tromboxano A₂; TXS: sintetasa de TXA₂; PGD₂: prostaglandina D₂; PGDS: sintetasa de PGD₂; PGE₂: prostaglandina E₂; PGES: sintetasa de PGE₂; PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}; PGFS: sintetasa de PGF_{2α}; IP, TP_{α/β}, DP, EP1-EP4, FP_{α/β}: receptores específicos de cada prostaglandina; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; Ca²⁺: calcio; IP₃: inositol trifosfato.

PGE₂ además estimula la producción del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (17, 18), molécula central para la formación de una red vascular nueva en la lesión endometriósica (19) y capaz además de estimular la expresión de COX-2 (20).

De esta forma, se establece un círculo de retroalimentación positiva en el que intervienen aromatasa, estrógenos, COX-2, PGE₂ y VEGF; todos ellos interrelacionados de manera tal que se activan y aumentan la producción y/o actividad de los otros, y estimulan la proliferación celular, la angiogénesis, la inflamación y por consiguiente, el dolor.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son una gran familia de drogas que inhiben la actividad de las COXs disminuyendo la producción de PGs y, en consecuencia, el dolor. Son comúnmente utilizados para el tratamiento de todo tipo de dolencia. Asimismo se desarrollaron inhibidores específicos de COX-2, que fueron llamados coxibs. Celecoxib pertenece a esta categoría de AINEs que inhiben de manera selectiva a COX-2. Celecoxib no ha sido aprobado aún para ser utilizado en el tratamiento de la endometriosis y no se han realizado estudios que evalúen su capacidad antiinflamatoria en mujeres

que sufren la enfermedad. A nivel experimental, existen antecedentes en distintos modelos de cáncer que advierten sobre sus efectos antiproliferativos, antiangiogénicos y proapoptóticos (21, 22). Hoy en día, celecoxib está aprobado para el tratamiento de poliposis adenomatosa familiar y como adyuvante en el tratamiento de cáncer de mama (23-26).

En base a estos antecedentes se plantean los siguientes **objetivos generales**:

Evaluar los efectos de celecoxib y anastrozole, por separado y combinados, sobre el desarrollo de la endometriosis en un modelo experimental en ratón.

Investigar el mecanismo de acción de la inhibición del crecimiento endometrial inducida por celecoxib y anastrozole en el modelo de endometriosis desarrollado en ratón.

MÉTODOS

Cirugía para la inducción de la endometriosis

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 2 meses de edad. Los animales se mantuvieron en jaulas ventiladas, teniendo acceso a agua y alimento *ad libitum* en el bioterio del IBYME. A todos los animales se les realizó la cirugía de inducción de endometriosis de acuerdo a lo descripto por nuestro laboratorio en trabajos previos. Este modelo animal ha sido aceptado para el estudio de la endometriosis en numerosos trabajos publicados (6, 27-30).

Tratamiento con celecoxib y anastrozole

Los ratones se dividieron en cuatro grupos experimentales de acuerdo al tratamiento que recibieron: Control (150 µl solución fisiológica vía intraperitoneal), Celecoxib (1500 ppm de alimento, Pfizer), Anastrozole (10 mg/kg, vía intraperitoneal, AstraZeneca) Celecoxib + Anastrozole (tratamiento combinado). Todos los tratamientos se iniciaron en el día 1 post-cirugía y se continuaron durante 28 días.

Evaluación del tejido ectópico

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical luego de las 4 semanas de tratamiento. Se abrió la cavidad abdominal, se contó el número de lesiones desarrolladas, se midieron los diámetros mayor y menor de cada

lesión con un calibre y se determinaron los radios mayor (R) y menor (r). El tamaño de la lesión se calculó utilizando la siguiente fórmula $V=(4/3)\pi.r^2.R$ (31). Luego las lesiones fueron extraídas y fijadas en formaldehído al 10%. El tejido ectópico fijado se embebió en parafina, se cortó en secciones de 5 µm de espesor y se tiñó con hematoxilina y eosina. Los cortes fueron examinados para confirmar la presencia de endometriosis.

Evaluación de la proliferación celular, expresión de COX-2 y densidad vascular en el tejido endometrial ectópico

La proliferación celular y la densidad vascular se evaluaron por inmunohistoquímica en cortes de tejido ectópico empleando un anticuerpo policlonal anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo monoclonal anti-CD34 (Abcam) respectivamente. Asimismo se evaluó la expresión de COX-2 con un anticuerpo anti-COX-2 (Santa Cruz Biotechnology).

La especificidad de la reacción se comprobó por incubación de las secciones con suero no inmune como sustituto del anticuerpo primario y se realizó el control de isotipo. Los porta objetos fueron evaluados al microscopio óptico a 400X de magnificación.

Las células positivas para PCNA se identificaron con un microscopio óptico de campo claro por la presencia de un precipitado nuclear marrón. La cuantificación de la proliferación celular se realizó contando un mínimo de 300 células epiteliales elegidas al azar y se calculó el porcentaje de células en proliferación sobre el total. Luego, los porcentajes se utilizaron para obtener la media de cada grupo experimental.

Para el cálculo del área vascularizada, se tomaron 10 fotografías por corte y las mismas se analizaron con el programa ImageJ para calcular el área vascularizada sobre el área total. El porcentaje de área positiva para CD34 se determinó por campo y se promedió por animal. Todos los porcentajes fueron utilizados para calcular la media del grupo experimental.

Evaluación de la apoptosis en el tejido ectópico

Para la cuantificación de la apoptosis, los cortes de tejido ectópico se sometieron a la técnica de marcación del extremo libre con nucleótidos acoplados a digoxigenina por medio de la enzima transferasa de nucleótidos (TdT-mediated dUTP Nick-End Labelling, TUNEL). Se utilizó el kit de detección de apoptosis Apoptag Plus (Chemicon International) que se fundamenta en la localización y marcación de los extremos 3'-OH que se generan por la

fragmentación del ADN en las células apoptóticas (32). Los controles positivos fueron suministrados por el fabricante del kit. Los controles negativos se obtuvieron sometiendo cortes de tejido a tratamiento idéntico a las muestras a evaluar pero sin el agregado de la enzima TdT.

Los porta objetos fueron evaluados al microscopio óptico a 400X de magnificación, se evaluaron 300 células epiteliales elegidas al azar como mínimo y se cuantificó el porcentaje de células apoptóticas sobre el total.

Análisis estadístico

De acuerdo a la distribución de los datos a comparar, el análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test de múltiples comparaciones de Dunn o mediante el test de ANOVA de una vía seguido del test de múltiples comparaciones de Bonferroni. Los resultados se expresaron como media $\pm$ SEM. Se consideraron estadísticamente significativos solamente aquellos valores cuyo $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Celecoxib inhibe el establecimiento y crecimiento de las lesiones endometriósicas en ratón

A partir de los resultados obtenidos *in vitro* (33), quisimos complementar los estudios y evaluar el efecto de celecoxib sobre el desarrollo de la endometriosis experimental en ratón.

Por otro lado, resultados previos obtenidos en el laboratorio demostraron un efecto beneficioso de los inhibidores de aromatasa sobre el crecimiento endometrial en cultivo y sobre el desarrollo de la endometriosis *in vivo* (5, 6). Además, numerosos trabajos reportaron un efecto significativo de la combinación de inhibidores de aromatasa con inhibidores de COX-2 sobre la inhibición del crecimiento tumoral (34). En base a estos datos, quisimos estudiar la acción de esa combinación en nuestro modelo experimental de endometriosis en ratón.

Los resultados demostraron que el tratamiento con celecoxib administrado de manera individual disminuyó de manera significativa el número de lesiones desarrolladas por ratón comparado con el grupo Control ($p < 0,05$) y, además, logró disminuir el crecimiento de las mismas. El tamaño promedio alcanzado por las lesiones establecidas fue significativamente menor en el grupo de ratones que recibió celecoxib (Figura 2, $p < 0,01$ vs. Control).

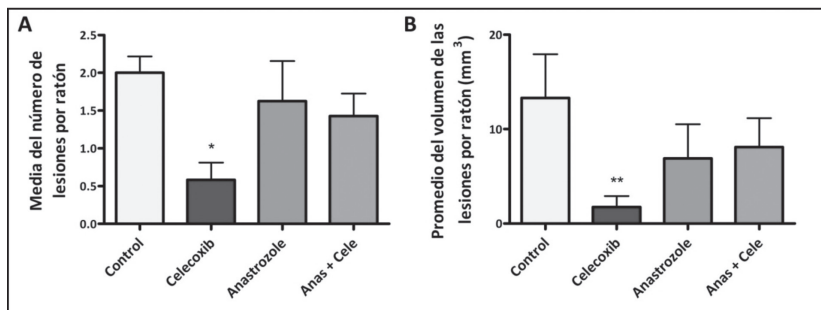


Figura 2 Efecto de celecoxib y anastrozole sobre el establecimiento y desarrollo de las lesiones endometrióticas. Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Luego de 4 semanas de tratamiento con vehículo, celecoxib, anastrozole o ambas drogas simultáneamente los animales se sacrificaron y el número de lesiones establecidas se contó y midió. **(A)** Celecoxib inhibe de manera significativa el número de lesiones establecidas por ratón. **(B)** Celecoxib provoca una disminución significativa del tamaño de las lesiones. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. grupo Control. $n = 9$ (Control), $n = 12$ (Celecoxib), $n = 8$ (Anastrozole), $n = 7$ (Anas + Cele).

Celecoxib estimularía y anastrozole inhibiría la expresión de COX-2

Se evaluó de manera cualitativa la expresión de la enzima COX-2 en las lesiones endometrióticas desarrolladas en ratón luego del tratamiento con el inhibidor de su actividad y el inhibidor de aromatasas.

Se observó expresión de COX-2 en las lesiones endometrióticas luego de todos los tratamientos aplicados. En todos los casos la expresión de COX-2 fue más alta en las células epiteliales que en las estromales (Figura 3).

Si bien no se realizó una evaluación cuantitativa, los resultados de las observaciones fueron claros en mostrar una disminución de la expresión de COX-2 en las lesiones endometrióticas provenientes de ratones tratados únicamente con anastrozole. Por otro lado, con el tratamiento combinado los niveles de expresión de la enzima resultaron semejantes al de los ratones controles, mientras que en los ratones tratados con celecoxib, la expresión de COX-2 fue más intensa que en los controles. Estos datos concuerdan con trabajos previos donde observamos que la expresión de COX-2 es estimulada por celecoxib en cultivos de CEE de pacientes con endometriosis (33). Además, resultados similares habían sido previamente reportados por otros autores en otros sistemas celulares (21, 35).

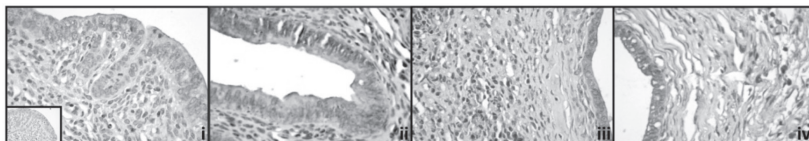


Figura 3 Evaluación de la expresión de COX-2 en las lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón. Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Luego de 4 semanas de tratamiento con vehículo, celecoxib, anastrozole o ambas drogas simultáneamente se evaluó la expresión de la enzima COX-2 por inmunohistoquímica. La expresión de la enzima es similar en las lesiones del grupo con el tratamiento combinado y el control, estaría aumentada en el grupo tratado con celecoxib y disminuiría luego del tratamiento con anastrozole. Micrografías representativas de la inmunomarcación de COX-2. Grupo Control (i), grupo Celecoxib (ii), grupo Anastrozole (iii), grupo Anas + Cele (iv). Recuadro: control negativo, suero no inmune. Magnificación x400. n = 5.

El desarrollo de las lesiones endometriósicas se ve afectado por el tratamiento con el inhibidor de COX-2 y el inhibidor de aromatasa

Como puede verse en la Figura 4, los tratamientos con celecoxib y anastrozole por separado lograron disminuir de manera significativa la proliferación celular en las lesiones endometriósicas en comparación con el grupo control ($p < 0,05$). Sin embargo, si bien se observa una tendencia hacia la disminución, no hemos podido demostrar una inhibición estadísticamente significativa de la proliferación celular en las lesiones endometriósicas provocada por el tratamiento combinado.

Además, complementariamente a los resultados de proliferación celular observados, el tratamiento con el inhibidor de COX-2 así como el tratamiento con el inhibidor de aromatasa administrados por separado, aumentaron de manera significativa el número de células en apoptosis dentro de la lesión endometriósica comparado con las lesiones provenientes de los ratones controles (Figura 4, $p < 0,05$ para los grupos Celecoxib y Anastrozole). Por otro lado, no observamos cambios en los niveles de apoptosis luego de la administración del tratamiento combinado.

Se evaluó y cuantificó, también, la densidad vascular en las lesiones endometriósicas a través del marcador endotelial CD34 (Figura 4). Solamente el tratamiento con celecoxib de manera individual provocó una disminución del área positiva para este marcador, lo que se traduce en una menor vascularización en las lesiones endometriósicas provenientes de ratones tratados con el inhibidor de COX-2 ($p < 0,05$ vs. grupo Control).

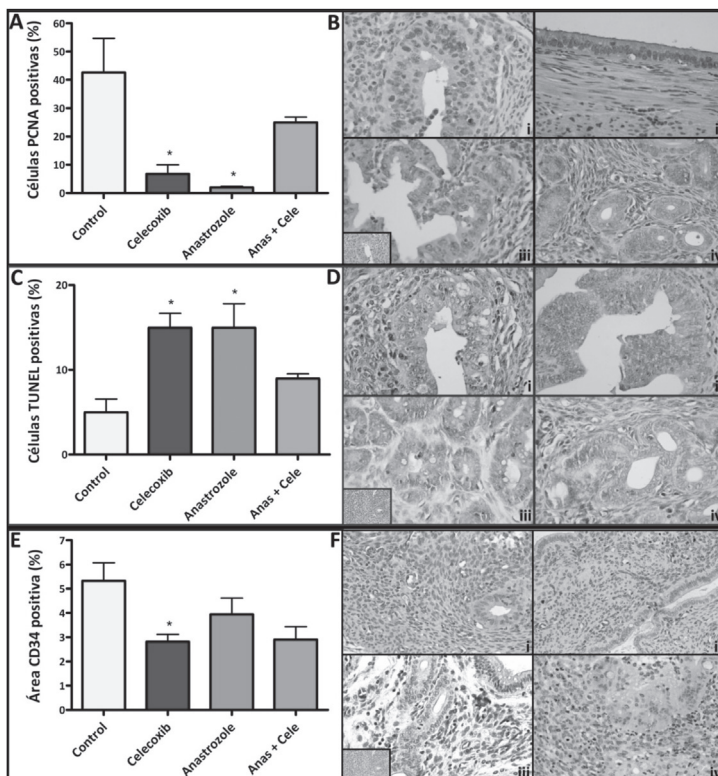


Figura 4: Efecto de celecoxib y anastrozole sobre la proliferación y muerte celular de células epiteliales y sobre la densidad vascular en lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón. Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Luego de 4 semanas de tratamiento se evaluó: (A y B) proliferación celular mediante inmunohistoquímica de PCNA, (C y D) apoptosis mediante la técnica de TUNEL y (E y F) la densidad vascular a través del marcador endotelial CD34. (A y C) Celecoxib y anastrozole administrados de manera independiente inhibieron de manera significativa la proliferación celular en las lesiones de ratón y aumentaron los niveles de apoptosis. (E) Celecoxib de manera individual disminuyó el área positiva para el marcador endotelial CD34. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. Control. (B, D y F) Micrografías representativas de la inmunomarcación de PCNA, TUNEL y CD34. Grupo Control (i), grupo Celecoxib (ii), grupo Anastrozole (iii), grupo Anas + Cele (iv). Recuadro: control negativo, (B y F) los cortes se incubaron con suero no inmune o (D) los cortes se incubaron en ausencia de la enzima TdT. Magnificación $\times 400$. $n = 5$.

En **conclusión**, nuestros estudios previos y este nuevo trabajo confirman una indudable eficacia de anastrozole y de celecoxib como monoterapias sobre la inhibición del desarrollo de la endometriosis experimental. Con respecto a la combinación de estas drogas, sabemos que este es el primer estudio que investiga esta posibilidad en la terapéutica en la endometriosis experimental. No obtuvimos efectos benéficos luego de la administración de celecoxib y anastrozole en forma conjunta y sugerimos que si bien la combinación puede generar un efecto antagónico, son necesarios más estudios para confirmar esta posibilidad.

ABSTRACT

Endometriosis is a benign gynecological disease. Cyclooxygenase (COX)-2 and aromatase proteins have been shown to be overexpressed in eutopic endometrium from women suffering from this disease compared to disease-free women. A feed forward loop has been described between aromatase and prostaglandin E² (PGE²) in endometriosis. Aromatase synthesizes estrogens, which in turn stimulate the production of PGE² via COX-2, and PGE² stimulates aromatase activity. This describes a perfect circle, in which high expression of aromatase will produce high concentrations of estrogens, which will stimulate COX-2 activity producing high concentrations of PGE², stimulating again aromatase. Considering the feed forward loop established between these molecules in endometriosis, we decided to investigate the effect of combining a COX-2 inhibitor with an aromatase inhibitor, celecoxib and anastrozole respectively, in a murine model of endometriosis. For this purpose, in this study, the effect of combining celecoxib and anastrozole on the implantation and growth of endometriotic like lesions in a murine model of endometriosis was evaluated. Endometriosis was surgically induced in female BALB/c mice. After 28 days of treatment with celecoxib, anastrozole or their combination, animals were sacrificed and lesions were counted, measured, excised and fixed. Immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen and CD34 were performed for assessment of cell proliferation and vascularization, as well qualitative expression of COX-2. TUNEL technique was performed for apoptosis evaluation. Celecoxib was the only treatment to significantly reduce the mean number of lesions established per mouse, their size and vascularized area. In addition, cell proliferation was significantly diminished and apoptosis was significantly enhanced by both individual

treatments. When the therapies were combined they reversed their effects. COX-2 expression immunostaining was augmented when its activity was inhibited, reduced when aromatase activity was inhibited and unaltered when both enzymes were inhibited. These results confirm that celecoxib and anastrozole separately decrease endometriotic growth, but when combined they might have antagonizing effects.

BIBLIOGRAFÍA

1. C. Bulletti, M. E. Coccia, S. Battistoni, A. Borini, *J. Assist. Reprod. Genet.* 27, 441 (2010).
2. S. E. Bulun, K. M. Zeitoun, K. Takayama, H. Sasano, *J. Mol. Endocrinol.* 25, 35 (2000).
3. M. Beresford *et al.*, *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* 23, 209 (2011).
4. K. Takayama *et al.*, *Fertil. Steril.* 69, 709 (1998).
5. G. F. Meresman *et al.*, *Fertil. Steril.* 84, 459 (2005).
6. M. Bilotas, G. Meresman, I. Stella, C. Sueldo, R. I. Baranao, *Fertil. Steril.* 93, 2513 (2010).
7. M. A. Fortier, K. Krishnaswamy, G. Danyod, S. Boucher-Kovalik, P. Chapdalaine, *J. Physiol Pharmacol.* 59 Suppl 1, 65 (2008).
8. H. N. Jabbour, K. J. Sales, O. P. Smith, S. Battersby, S. C. Boddy, *Mol. Cell Endocrinol.* 252, 191 (2006).
9. A. D. Ebert, J. Bartley, M. David, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 122, 144 (2005).
10. S. Matsuzaki *et al.*, *Fertil. Steril.* 82, 1309 (2004).
11. H. Ota, S. Igarashi, M. Sasaki, T. Tanaka, *Hum. Reprod.* 16, 561 (2001).
12. R. Gazvani, A. Templeton, *Reproduction.* 123, 217 (2002).
13. A. Raiter-Tenenbaum, R. I. Baranao, J. J. Etchepareborda, G. F. Meresman, L. S. Rumi, *Arch. Gynecol. Obstet.* 261, 147 (1998).
14. M. H. Wu *et al.*, *Mol. Hum. Reprod.* 8, 1103 (2002).
15. M. H. Wu, C. W. Lu, P. C. Chuang, S. J. Tsai, *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 235, 668 (2010).
16. J. C. Huang, M. Y. Dawood, *Fertil. Steril.* 70, 734 (1998).
17. S. Gately, W. W. Li, *Semin. Oncol.* 31, 2 (2004).
18. X. H. Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277, 50081 (2002).
19. J. L. Mahnke, M. Y. Dawood, J. C. Huang, *Fertil. Steril.* 73, 166 (2000).
20. K. Tamura, T. Sakurai, H. Kogo, *Vascul. Pharmacol.* 44, 411 (2006).
21. G. D. Basu, L. B. Pathangey, T. L. Tinder, S. J. Gendler, P. Mukherjee, *Breast Cancer Res.* 7, R422 (2005).
22. K. S. Chun, Y. J. Surh, *Biochem. Pharmacol.* 68, 1089 (2004).
23. G. D. Basu *et al.*, *J. Immunol.* 177, 2391 (2006).
24. C. Falandry, P. A. Canney, G. Freyer, L. Y. Dirix, *Ann. Oncol.* 20, 615 (2009).
25. T. Iwama, *J. Gastroenterol.* 44 Suppl 19, 72 (2009).

26. P. M. Lynch *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.* 105, 1437 (2010).
27. A. G. Ricci, C. N. Olivares, M. A. Bilotas, G. F. Meresman, R. I. Baranao, *Reprod. Sci.* 18, 614 (2011).
28. C. Olivares, A. Ricci, M. Bilotas, R. I. Baranao, G. Meresman, *Fertil. Steril.* 96, 428 (2011).
29. Z. Fang *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 3460 (2002).
30. C. N. Olivares, M. A. Bilotas, A. G. Ricci, R. I. Baranao, G. F. Meresman, *Reproduction.* 145, 119 (2013).
31. A. Brodie, D. Jelovac, B. J. Long, *Clin. Cancer Res.* 9, 455S (2003).
32. R. T. Allen, W. J. Hunter, III, D. K. Agrawal, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 37, 215 (1997).
33. C. Olivares *et al.*, *Hum. Reprod.* 23, 2701 (2008).
34. P. H. Graham, *Expert. Opin. Pharmacother.* 8, 2347 (2007).
35. P. A. Ohneseit, G. Krebiehl, K. Dittmann, R. Kehlbach, H. P. Rodemann, *Radiother. Oncol.* 82, 229 (2007).

FOLICULOGENESIS Y POLIQUISTOSIS OVARICA. ROL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES ACTIVADOS POR LOS PEROXISOMAS GAMA (PPAR GAMA)”

Alicia Beatriz Motta

Laboratorio de Fisiopatología Ovárica. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO), UBA- CONICET. Facultad de Medicina, UBA

Los resultados fueron publicados en que se desprendieron del presente Subsidio fueron publicados en:

“Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and early folliculogenesis during an acute hyperandrogenism condition”. M. Faut, E Elia, F Parborell, N Cugnata, M. Tesone, AB Motta. *Fertility and Sterility*, 95¹: 333-337, 2011

“Alterations of folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome”. VA Sander, MB Hapon, L Sícara, E Lombardi, GA Jahn and AB Motta. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 124; 58-64, 2011

“The link between metformin and the proliferator-activated receptor gamma pathway in the uterine tissue of hyperandrogenized prepubertal mice”. E Elia, C. Pustovrh, S. Amalfi, L Devoto, AB Motta. *Fertility and Sterility*, 95⁸: 2534-2537, 2011

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se caracterizó por cubrir los siguientes aspectos

Se caracterizaron los cambios fisiológicos que ocurren durante la foliculogénesis temprana, observándose que:

Los niveles de progesterona sérica aumentan durante las primeras etapas de la foliculogénesis, mostrando un pico a la 8hs post-estimulación. Esto determina la funcionalidad máxima del ovario, traducida en una capacidad esteroidogénica óptima.

Durante la funcionalidad máxima del ovario, el peso relativo de los mismos aumentan debido a un incremento en el número de folículos sanos. Durante las primeras 8 horas de la foliculogénesis, ocurre un incremento en el número de folículos primarios mostrando una aceleración en el reclutamiento folicular.

Tanto la expresión génica como proteica de PPAR γ aumentan durante la foliculogénesis temprana, y esto se correlaciona con un aumento en la

expresión de StAR y P450scc, ambas, proteína y enzima, claves en la esteroidogénesis folicular. No ocurre así con la expresión de 3bHSD. Yo pondría StAR, P450scc y 3b luego de progesterona y en un ítem aparte PPAR por ser un factor de transcripción que regula enzimas de la esteroidogénesis.

Durante la foliculogénesis temprana en un estado hiperandrogénico, se observaron alteraciones en la estructura y funcionalidad de los ovarios:

Los niveles de progesterona sérica disminuyen hacia valores control. Esto se corresponde con una deficiencia funcional por parte de los folículos.

Los niveles del ARNm de P450scc disminuyen, y esto se correlaciona con la disminución en la expresión proteica de PPARg. Esto indicaría que existe una regulación positiva por parte de PPARg sobre la expresión de P450scc, no así sobre StAR ni 3bHSD.

Existe un aumento en los niveles de apoptosis y en el estado oxidativo de estos ovarios, lo que se correlaciona con un aumento en el número de folículos atrésicos en estas condiciones.

En vista de lo expuesto en este trabajo, podemos concluir que PPARg juega un rol fundamental durante la foliculogénesis temprana, actuando como factor de transcripción de distintos genes, entre ellos el de P40scc. Así como, aseverar, que en condiciones de hiperandrogenismo se altera la expresión de este receptor que, entre otros factores, modifica la funcionalidad ovárica, comprometiendo el correcto desarrollo folicular.

ABSTRACT

Acute hyperandrogenism decreases serum progesterone levels and induces early apoptosis of antral follicles by a mechanism mediated by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma system (PPAR gamma). The PPAR gamma actions are independent of the steroidogenic acute regulator proteína (StAR) pathway but involve the regulation of the main enzymes which regulate ovarian steroidogenesis such as: cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc), hydroxysteroid dehydrogenase (3 b HSD) and P450 aromatase (P450 arom). We conclude that PPAR gamma plays a fundamental role during the early folliculogenesis during physiological and hyperandrogenized processes. That role is mediated by the modulation of ovarian steroidogenic enzymes. These data could explain the fact that glitazones, synthetic ligands of PPAR gamma are able to modulate ovarian steroidogenesis

in women with Polycystic Ovary Syndrome and led to know the regulated pathways.

REFERENCIAS

1. Fernandez-Fernandez R, Martín A.C., Navarro V.M., Castellano J.M., Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol. Cel. Endocrinol.* 2006;127-132.
2. Iuorno MJ, Nestler JE. The polycystic ovary syndrome: treatment with insulin sensitizing agents. *Diabetes Obes Metab.* 1999;1(3):127-136.
3. Seli E, Duleba AJ. Treatment of PCOS with metformin and other insulin-sensitizing agents. *Curr Diab Rep.* 2004;4(1):69-75.
4. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodyear LJ. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(7):2074-2081.
5. Elia E, Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Di Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB. The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mol. Hum. Reprod.* 2006;2:475-481.
6. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990;347(6294):645-650.
7. Komar CM. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function – implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005;3:41-55.
8. Higashiyama H, Billin AN, Okamoto Y, Kinoshita M, Asano S. Expression profiling of peroxisome proliferator-activated receptor-delta (PPAR-delta) in mouse tissues using tissue microarray. *Histochem. Cell. Biol.* 2007;127(5):485-494.
9. Froment P, Fabre S, Dupont J, Pisselet C, Chesneau D, Staels B, Monget P. Expression and Functional Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g in Ovarian Folliculogenesis in the Sheep. *Biol. Reprod.* 2003;69:1665–1674.
10. Ibabe A, Grabenbauer M, Baumgart E, Fahimi HD, Cajaraville MP. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Histochem. Cell. Biol.* 2002;118(3):231-9.
11. Crawford MJ, Liversage RA, Varmuza SL. Two isoforms of *Xenopus* retinoic acid receptor gamma 2 (B) exhibit differential expression and sensitivity to retinoic acid during embryogenesis. *Dev. Genet.* 1995;17(4):291-302.
12. Mohan M, Malayer JR, Geisert RD, Morgan GL. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos. *Biol. Reprod.* 2002;66(3):692-700.
13. Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Strauss JF 3rd. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(2):705-713.

14. Huang Z, Zhou X, Nicholson AC, Gotto AM Jr, Hajjar DP, Han J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice induces expression of the hepatic low-density lipoprotein receptor. *Br. J. Pharmacol.* 2008;155(4):596-605.
15. Cui Y, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist UK, Gonzalez FJ, Flaws J, Wagner KU, Hennighausen L. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPARgamma) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J. Biol. Chem.* 2002;277(20):17830-5.
16. Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Arcos ML, Gonzalez C, Di Girolamo G, Chiocchio S, Cremaschi G, Motta AB. Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *J. Reprod. Immunol.* 2004;64:59-74.
17. Sander V, Solano ME, Elia E, Luchetti CG, Gonzalez C, Di Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB. The influence of dehydroepiandrosterone on early pregnancy in mice. *Neuroimmunomodulation.* 2005;12:285-292.
18. Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Elia EM, Di Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB. Role of the N,N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction.* 2006;131:591-602.
19. Solano ME, Sander V, Elia E, Luchetti CG, Di Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB. Metformin prevents embryonic resorption induced by hyperandrogenization with dehydroepiandrosterone in mice. *Reprod. Fert. Dev.* 2006;18:533-544.
20. Belgorosky D, Sander VA, Yorio MP, Faletti AG, Motta AB. Hyperandrogenism alters intraovarian parameters during early folliculogenesis in mice. *Reprod. Biomed. Online.* 2010 Feb 14. [Epub ahead of print].
21. Dupont J, Chabrolle C, Ramé C, Tosca L, Coyral-Castel S. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors, adenosine monophosphate-activated kinase, and adiponectin in the ovary. *PPAR Res.* 2008;176-275.
22. Irusta G, Parborell F, Peluffo M, Manna PR, Gonzalez-Calvar SI, Calandra R, Stocco DM, Tesone M. Steroidogenic acute regulatory protein in ovarian follicles of gonadotropin-stimulated rats is regulated by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod.* 2003;68(5):1577-83.
23. Motta AB, Estévez A, Tognetti T, Gimeno MAF. Dual effect of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum. *Mol. Hum. Reprod.* 2001;7: 43-47.
24. Woodruff TK, Lyon RJ, Hansen SE, Rice GC, Mather JP. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology.* 1990;127:3196-3205.
25. Solano ME, Sander V, Wald MR, Motta AB. Dehydroepiandrosterone and metformin regulate proliferation of murine T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 2008;153(2):289-296.
26. Parborell F, Abramovich D, Tesone M. Intrabursal administration of the antiangiopoietin 1 antibody produces a delay in rat follicular development associated with an increase in ovarian apoptosis mediated by changes in the expression of BCL2 related genes. *Biol. Reprod.* 2008;78, 506-513.
27. Gasic S, Bodenbun Y, Nagamani M, Green A, Urban RJ. Troglitazone inhibits progesterone production in porcine granulosa cells. *Endocrinology.* 1998;139(12):4962-4966.
28. Komar CM, Braissant O, Wahli W, Curry Jr TE. Expression and Localization of

- PPARs in the Rat Ovary During Follicular Development and the Periovarian Period. *Endocrinology*. 2001;142(11):4831–4838
29. San-Millán JL, Escobar-Morreale HF. The role of genetic variation in peroxisome proliferator-activated receptors in the polycystic ovary syndrome (PCOS): an original case-control study followed by systematic review and meta-analysis of existing evidence. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(3):383-392.
 30. Day C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med*. 1999;16(3):179-192.
 31. Iuorno MJ, Nestler JE. Insulin-lowering drugs in polycystic ovary syndrome. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 2001;28(1):153-164.
 32. Girard J. Mechanisms of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab*. 2001;27(2 Pt 2):271-278.
 33. Seli E, Duleba AJ. Treatment of PCOS with metformin and other insulin-sensitizing agents. *Curr. Diab. Rep.* 2004;4(1):69-75.
 34. Minge CE, Ryan NK, Van Der Hoek KH, Robker RL, Norman RJ. Troglitazone regulates peroxisome proliferator-activated receptors and inducible nitric oxide synthase in murine ovarian macrophages. *Biol. Reprod.* 2006;74(1):153-160.
 35. Brannian JD, Eyster KM, Weber M, Diggins M. Pioglitazone administration alters ovarian gene expression in aging obese lethal yellow mice. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008;18;6:10.
 36. Sander VA, Facorro GB, Piehl L, Rubín de Celis E, Motta AB. Effect of DHEA and metformin on corpus luteum in mice. *Reproduction*. 2009;138(3):571-579.
 37. Simpson ER, McCarthy JL, Peterson JA. Evidence that the cycloheximide-sensitive site of adrenocorticotrophic hormone action is in the mitochondrion. Changes in pregnenolone formation, cholesterol content, and the electron paramagnetic resonance spectra of cytochrome P-450. *J Biol Chem*. 1978;10;253(9):3135-3139.
 38. Stocco DM, Clark BJ. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem. Pharmacol.* 1996;51(3):197-205.
 39. Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev*. 1996;17(3):221-244.
 40. Stocco DM. (1997). The steroidogenic acute regulatory (StAR) protein two years later. An update. *Endocrine* 6:99–109.
 41. Devoto L, Kohen P, Vega M, Castro O, González RR, Retamales I, Carvallo P, Christenson LK, Strauss JF. Control of human luteal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;186(2):137-141.
 42. Yazawa T, Inaoka Y, Okada R, Mizutani T, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Orisaka M, Umezawa A, Miyamoto K. PPAR-gamma coactivator-1alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with SF-1 and LRH-1. *Mol. Endocrinol*. 2010;24(3):485-496.
 43. Li MY, Yuan H, Ma LT, Kong AW, Hsin MK, Yip J, Underwood MJ, Chen GG. Roles of PPAR{alpha} and PPAR{gamma} in the Development of Non-small Cell Lung Cancer. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. 2010;15. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20081051.
 44. Yan KH, Yao CJ, Chang HY, Lai GM, Cheng AL, Chuang SE. The synergistic anticancer effect of troglitazone combined with aspirin causes cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer cells. *Mol. Carcinog*. 2010;49(3):235-246.

45. Shim J, Kim BH, Kim YI, Kim KY, Hwangbo Y, Jang JY, Dong SH, Kim HJ, Chang YW, Chang R. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands, pioglitazone and 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2), have antineoplastic effects against hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 2010;36(1):223-231.
46. Park SH. Current status of liver disease in Korea: nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J. Hepatol.* 2009;15(6):34-39.
47. Milkevitch M, Beardsley NJ, Delikatny EJ. Phenylbutyrate induces apoptosis and lipid accumulations via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *NMR Biomed.* 2010;11. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20225233.
48. Bruedigam C, Eijken M, Koedam M, van de Peppel J, Drabek K, Chiba H, van Leeuwen JP. A New Concept Underlying Stem Cell Lineage Skewing That Explains the Detrimental Effects of Thiazolidinediones on Bone. *Stem Cells.* 2010;8. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20213769.
49. Chen Q, Sun X, Chen J, Cheng L, Wang J, Wang Y, Sun Z. Direct rosiglitazone action on steroidogenesis and proinflammatory factor production in human granulosa-lutein cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:147.

EPIDEMIOLOGIA DE LA RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS Y SU RELACIÓN CON MYCOPLASMA, UREAPLASMA Y CLAMIDIA

Dres. Salvador Natale, Marina Sabaris, Yessi Rode.

Obst. Liliana Accarezzato.

Hospital Mariano y Luciano de la Vega. Moreno. Servicio de Tocoginecología.

INTRODUCCIÓN

La ruptura prematura de membranas (RPM), es una complicación propia del embarazo que ocurre con una frecuencia promedio de un 10%. De este 10%, el 80% se produce después de la semana 37 de embarazo y el resto (20%) en embarazos pre términos.

La RPM se define como la rotura la membrana corioamniótica, antes del comienzo del trabajo de parto.

Entre los factores de riesgo para RPM se observan varias condiciones: parto prematuro, previo consumo de cigarrillos, metrorragias durante el embarazo actual y en menor magnitud vaginosis bacteriana. Esta última es una condición de desbalance de la flora comensal. Se caracteriza por reducción o ausencia de la flora lactobacilar y su reemplazo por otros microorganismos entre los que se destacan *Gardnerella vaginalis*, algunos anaerobios: *Peptostreptococcus*, *Prevotella* spp., *Mobiluncus* spp y un aumento en la colonización *Mycoplasmas* genitales (*mycoplasma hominis* y *ureaplasma urealyticum*).

Los micoplasmas son organismos que pertenecen a la clase de los *Mollicutes*, que comprenden cerca de 200 especies, de las cuales la mayoría pertenece al género *Mycoplasma*. En general, este término se utiliza para describir cualquier microorganismo dentro del género o la especie. Presentan una membrana externa de 3 capas, insensible a los beta lactámicos. De las 16 especies de micoplasmas detectadas en los seres humanos, 6 (quizá, 7) tienen al aparato urogenital como sitio primario de colonización. Cualquier relación entre las infecciones por micoplasmas y las complicaciones del embarazo puede confirmarse sólo por un diagnóstico microbiológico. *M. fermentans* se encuentra en el aparato urogenital, en la garganta y en los leucocitos, en tanto que *M. hominis* y *Ureaplasma urealyticum* son los organismos aislados con mayor frecuencia del aparato urogenital humano.

Luego de la pubertad, la colonización por *M. hominis* y ureaplasmas se produce principalmente por contacto sexual y aumenta con el número de distintas parejas.

Debe reconocerse la importancia de la vaginosis bacteriana (VB). Numerosos estudios han mostrado que las mujeres con este trastorno presentan mayor predisposición a un nacimiento prematuro o a un aborto. En la VB, la flora bacteriana vaginal dominante, como los lactobacilos, es reemplazada por otra en la que predominan los cocobacilos gramnegativos. Además, las mujeres con VB tienen *M. hominis* con más frecuencia y en mayor número que aquellas que no presentan esta enfermedad. A pesar de que este micoplasma por sí solo puede desempeñar un papel importante en el desarrollo del parto prematuro (PP), es más probable que actúe en conjunto con otras bacterias y que sea una parte integral de la patogenia de esta patología.

La endometritis es la causa más frecuente de fiebre posparto, ya sea en las primeras 24 a 48 horas o luego. Es difícil establecer la relación entre los micoplasmas y la fiebre posterior al parto.

En un estudio en el que se examinó la superficie amniótica de las placentas obtenidas durante las cesáreas, se halló que las pacientes con cultivos positivos para *M. hominis* o ureaplasmas fueron más susceptibles a presentar registros febriles luego del parto que aquellas con cultivos con resultados negativos. La búsqueda de micoplasmas en la sangre es quizá la mejor manera de establecer una relación con la fiebre. Se han presentado varios estudios de mujeres con fiebre posparto en cuya sangre se aisló *M. hominis* 1 o 2 días después del parto, acompañada por una respuesta de anticuerpos en la mayoría de los casos. La asociación de *M. hominis* con los abortos febriles es indudable.

La Clamidia es una infección de transmisión sexual (ITS) o enfermedad de transmisión sexual (ETS) de origen bacteriano dada su modalidad de transmisión, que es una de las más extendidas en los países industrializados, conjuntamente con la infección por herpes y la infección por virus del papiloma humano (VPH), es causada por la colonización, a nivel de los órganos genitales de varones y mujeres, de la bacteria intracelular gram-negativa *Chlamydia trachomatis* (la misma que es también causante del cuadro clínico denominado tracoma). Su importancia radica en la magnitud de la diseminación de esta enfermedad, las características peculiares de su presentación clínica y las complicaciones que pueden surgir a causa de una falta de diagnóstico o tratamiento o de ambos. De allí que se requiere de exámenes de laboratorio especiales para realizar el correspondiente diagnóstico de la enfermedad.

PATOGENIA

Los gérmenes producen un aumento de los macrófagos que liberan mediadores (citoquinas) generando una respuesta inflamatoria.

Los marcadores endógenos de la inflamación son:

- Interleukina 1-2-6-8-10
- Factor de necrosis tumoral (FNT)
- Factor de activación plaquetaria (FAP)
- Factores estimulantes del crecimiento de colonias (CSFs)
- Proteína inhibidora de macrófagos 1 alfa (MIP 1 alfa)

Los marcadores endógenos de la inflamación estimulan la síntesis de prostaglandinas y aumentan la actividad colagenasa y elastasa. Varios autores han demostrado que los productos bacterianos son una fuente de fosfolipasa A2 y C, pudiendo estimular también por esta vía la producción de prostaglandinas.

La presencia de estos factores vuelve al útero más sensible a: la ocitocina y a las prostaglandinas E2 y F2 alfa. La consecuencia es: daño en la membrana y aumento de la contractilidad por la vía de la adenilciclase.

La resistencia de las membranas marcará el camino hacia una RPM o hacia un parto prematuro con bolsa íntegra.

DELIMITACIÓN AL PROBLEMA

¿Cuál es la epidemiología de la ruptura prematura de membranas y su relación con el Mycoplasma, Ureaplasma y Clamidia en la población del Servicio de Tocoginecología del Hospital Mariano y Luciano de la Vega, de la localidad de Moreno, de la Provincia de Buenos Aires, en el período de un año.

PROPOSITO

Lograr describir la epidemiología de la RPM, discriminando su prevalencia y los factores de riesgo con Mycoplasma, Ureaplasma y Clamidia, en las pacientes atendidas en nuestro Servicio.

OBJETIVOS

1. Conocer la prevalencia de la R P M en el Servicio.
2. Caracterizar su relación con el Mycoplasma, Ureaplasma y Clamidia.

MATERIAL Y METODO

Se incluyen en el presente estudio todas las pacientes atendidas en el Servicio de Tocoginecología, desde el 1 de enero al 31 de diciembre de 2011.

Es un estudio prospectivo observacional, realizado por el personal médico y profesionales obstétricas del Hospital.

Criterios de inclusión:

Se incluyeron todas las pacientes ingresadas al Servicio, con rotura prematura de membranas, y se las dividió según edad gestacional, en menores de 28 semanas, de 28 a 34 semanas y más de 34 semanas hasta las 37. A todas ellas se les realizó toma de cultivo de líquido amniótico en condiciones de asepsia y antisepsia, que fue remitido para su estudio al Laboratorio del Hospital.

Criterios de exclusión:

Se excluyeron del estudio aquellas pacientes que no hubieran recibido atención en un término menor a las 6 horas de producida o constatada la RPM., o cuya recolección no se haya producido en las condiciones adecuadas, antes mencionadas.

RESULTADOS

Durante el período que va del 1° de enero hasta el 31 de diciembre de 2011, se produjeron en el Hospital Mariano y Luciano de la Vega, de Moreno, 4212 nacimientos entre partos vaginales y cesáreas.

Se contabilizaron 387 (9,2%) pacientes que ingresaron al Servicio con RPM. A todas ellas se les constató la pérdida de líquido amniótico (LA) en forma fehaciente.

Diagnóstico presuntivo

Se observa salida de LA por genitales en forma espontánea o con el rechazo de la presentación (maniobra de Tarnier).

No se observa LA pero **la paciente refiere pérdidas** con esas características.

Diagnóstico de certeza

Especuloscopía: LA saliendo por el orificio cervical.

Microscopía: cristalización en hojas de helecho del LA tomado del fondo de saco vaginal posterior.

Ecografía: disminución importante del volumen de LA asociado a la referencia de pérdida del mismo por parte de la madre.

PH vaginal: cambio a la alcalinidad por la presencia de LA. Esto hace virar el papel indicador (papel de nitrazina) porque de pH ácido (ph normal de la vagina) pasa a tener pH alcalino.

Ante la presencia de sangre en la vagina efectuar lavados con dextrosa 5% y luego realizar la toma (nunca lavar con solución fisiológica porque cristaliza).

Sospechar ante un oligoamnios con antecedentes de pérdida de LA.

Diagnóstico diferencial

Flujo vaginal: No es líquido, no cristaliza y no produce oligoamnios.

Expulsión del tapón mucoso: Es de consistencia mucosa, no cristaliza ni da oligoamnios.

Pérdida de orina: Es líquida pero no cristaliza ni da oligoamnios.

Pérdida de líquido proveniente del espacio corioamniótico: Es de escasa cantidad, no se repite ni produce oligoamnios.

La especuloscopía, la microscopía y la ecografía tendrán la última palabra.

De estas 387 pacientes, se descartaron del estudio, siguiendo los criterios de exclusión 81 mujeres, por lo tanto quedaron para el presente estudio, 306 pacientes que cumplían con los requisitos planteados y que dividimos según edad gestacional, quedando de la siguiente forma los grupos:

MENORES DE 28 SEMANAS: 94 CASOS (31%)

ENTRE 28 Y 34 SEMANAS; 85 CASOS (28%)

ENTRE 34 Y 37 SEMANAS: 127 CASOS (41%)

A todas ellas se les realizó el estudio para gérmenes especiales, en el laboratorio del Hospital y se cubrió adecuadamente con antibióticos (ATB).

Los ATB usados en las pacientes fueron:

AZITROMICINA 500 mg. /día, durante 5 días.

CLARITROMICINA 500 mg. cada 8 hs., durante 7 días.

AMPI- SULBACTAM 750 mg. cada 12 hs, durante 10 días, ante cultivo positivo para estreptococo grupo B.

RESULTADOS DE CULTIVOS

	Total de muestras	Resultados +	Resultados -	Otros gérmenes
CLAMIDIA	306	37(12, 09%)	12 (3,9%)	27 (8,8%)
MYCOPLASMA	306	34 (11,1%)	11 (3,5%)	23 (7,5%)
UREAPLASMA	306	106 (34,6%)	25 (8,16%)	31 (10,1%)

Dentro de otros gérmenes encontrados destacamos la presencia de:

Neisseria gonorrhea, gardnerella vaginalis, trichomonas vaginalis, cándida albicans, estreptococo grupo B, anaerobios (Fusobacterium), estafilococo aureus.

CONSIDERACIONES

Primero debemos destacar la estrecha relación de la RPM y las infecciones del amnios.

Si bien no todos los cultivos dieron positivos, en nuestra población de estudio hay una alta incidencia de casos de ureaplasma asociados a la RPM. Y en menor medida con mycoplasma y clamidia.

Esta incidencia se vio reflejada en los casos de menos de 28 semanas, donde el tratamiento elegido fue Claritromicina, lo cual nos permitió mejorar la posibilidad de mantener el feto intraútero por más tiempo, mejorando los resultados perinatales.

El ureaplasma es el agente de mayor prevalencia en nuestra serie.

Otro dato relevante, es que el mycoplasma siempre se encontró asociado con otros agentes.

Existe información sobre la probable participación de ureaplasma en patología respiratoria crónica neonatal. Sin embargo, se ha establecido recientemente que la patología respiratoria (displasia broncopulmonar), tiene relación con la reducción de la edad gestacional y es independiente del peso al nacer y de la colonización con el mismo.

No hay pruebas claras de la efectividad de los programas de detección de infección del aparato genital inferior para prevenir el parto prematuro. La instauración de un programa de detección y tratamiento de infecciones vaginales asintomáticas podría reducir el riesgo de PP, pero no está claro si todas las mujeres se deben someter a un screening sistemático, con qué frecuencia y que pruebas se deben realizar. Ya que no es posible precisar que efectos tiene sobre el parto prematuro la infección recurrente o persistente.

CONCLUSIONES

La infección parece jugar un papel importante en la proporción de PP espontáneos.

La evidencia científica no apoya el screening sistemático y tratamiento en todas las gestantes asintomáticas para prevenir el PP, excepto en mujeres con historia de prematuridad.

Sin embargo el CDC, el American College of Obstetrician and Gynecologist (ACOG), la American Academy of Family Physicians y la British Association for Sexual Health establecen que en mujeres de alto riesgo el screening y tratamiento puede ser beneficioso.

El CDC y el ACOG recomiendan screening de *chlamydia* en embarazadas de riesgo. No existe consenso sobre si el ureaplasma es un patógeno genital o su papel sobre el PP. El screening no está justificado por la insuficiente información que existe acerca de su patogenicidad.

La evidencia científica no apoya el screening sistemático y tratamiento en todas las gestantes asintomáticas para prevenir el PP, excepto en mujeres con historia de prematuridad. Sin embargo, nosotros lo hemos implementado como norma y lo propiciamos hacia otros Servicios, hacer el estudio sistemático mediante cultivos, a toda paciente con RPM; y la medicación correspondiente de las mismas con ATB.

Son necesarios nuevos estudios clínicos para evaluar el papel de la infección del tracto genital inferior en el PP y determinar el impacto del tratamiento antibiótico, especialmente en mujeres de bajo riesgo.

RESUMEN

Se realizó en el HOSPITAL MARIANO Y LUCIANO DE LA VEGA, DE LA LOCALIDAD DE MORENO, PROVINCIA DE BUENOS AIRES, un estudio prospectivo observacional, para evaluar la prevalencia de ruptura prematura de membranas y su relación con gérmenes especiales como son la clamidia, el micoplasma y el ureaplasma. El estudio abarca los partos producidos en el Servicio desde el 1 de enero al 31 de diciembre de 2011. Durante ese lapso se produjeron 4212 partos, de los cuales se contabilizaron 387 (9,2%) pacientes que ingresaron al Servicio con RPM. A todas ellas se les constató la pérdida de líquido amniótico (LA) en forma fehaciente.

Criterios de inclusión: Se incluyeron todas las pacientes ingresadas al Servicio, con rotura prematura de membranas, y se las dividió según edad gestacional, en menores de 28 semanas, de 28 a 34 semanas y más de 34 semanas hasta las 37. A todas ellas se les realizó toma de cultivo de líquido amniótico en condiciones de asepsia y antisepsia, que fue remitido para su estudio al Laboratorio del Hospital.

Criterios de exclusión: Se excluyeron del estudio aquellas pacientes que no hubieran recibido atención en un término menor a las 6 horas de producida o constatada la RPM., o cuya recolección no se haya producido en las condiciones adecuadas, antes mencionadas.

De estas 387 pacientes, se descartaron del estudio, siguiendo los criterios de exclusión 81 mujeres, por lo tanto quedaron para el presente estudio, 306 pacientes que cumplían con los requisitos planteados y que dividimos según edad gestacional, quedando de la siguiente forma los grupos:

MENORES DE 28 SEMANAS: 94 CASOS (31%)

ENTRE 28 Y 34 SEMANAS: 85 CASOS (28%)

ENTRE 34 Y 37 SEMANAS: 127 CASOS (41%)

A todas ellas se les realizó el estudio para gérmenes especiales, en el laboratorio del Hospital y se cubrió adecuadamente con antibióticos (ATB).

Los ATB usados en las pacientes fueron:

AZITROMICINA 500 mg. /día, durante 5 días.

CLARITROMICINA 500 mg. cada 8 hs., durante 7 días.

AMPI- SULBACTAM 750 mg. cada 12 hs, durante 10 días, ante cultivo positivo para estreptococo grupo B.

Resultados de cultivos

Total de muestras	Resultados +	Resultados -	Otros gérmenes
CLAMIDIA	306	37(12, 09%) 12 (3,9%)	27 (8,8%)
MYCOPLASMA	306	34 (11,1%) 11 (3,5%)	23 (7,5%)
UREAPLASMA	306	106 (34,6%) 25 (8,16%)	31 (10,1%)

Dentro de otros gérmenes encontrados destacamos la presencia de:

Neisseria gonorrhea, *gardnerella vaginalis*, *trichomonas vaginalis*, *cándida albicans*, estreptococo grupo B, anaerobios (*Fusobacterium*), estafilococo aureus.

Consideraciones:

Primero debemos destacar la estrecha relación de la RPM y las infecciones del amnios.

Si bien no todos los cultivos dieron positivos, en nuestra población de estudio hay una alta incidencia de casos de ureaplasma asociados a la RPM. Y en menor medida con mycoplasma y clamidia.

El ureaplasma es el agente de mayor prevalencia en nuestra serie.

Otro dato relevante, es que el mycoplasma siempre se encontró asociado con otros agentes.

Conclusiones:

La evidencia científica no apoya el screening sistemático y tratamiento en todas las gestantes asintomáticas para prevenir el PP, excepto en mujeres con historia de prematuridad. Sin embargo, nosotros hemos implantado como norma y lo propiciamos hacia otros Servicios, el estudio sistemático mediante cultivos, a toda paciente con RPM; y la medicación correspondiente de las mismas con ATB.

SUMMARY

A prospective study was carried out at "Mariano and Luciano de la Vega" Hospital to assess the prevalence of premature rupture of membranes and its connection to special germs such as chlamydia, mycoplasma and urea plasma. The study comprises deliveries that took place in the Hospital from January 1st to December 31st 2011. 4212 deliveries took place in that period and 387 (9,2%) of those patients were admitted to the department with PMR.

Inclusion criteria: all patients admitted to the department who presented premature rupture of membranes were included in the study and they were divided in three groups according to their gestational stage: less than 28 weeks of pregnancy, between 28 and 34 weeks of pregnancy and more than 34 weeks to 37 weeks of pregnancy. A sample of amniotic fluid was taken from all of the patients, under strict aseptic and antiseptic conditions, and was sent to the Hospital Lab for analysis.

Exclusion criteria: All the patients who did not receive any medical attention within the first six hours after the PMR took place or if the culture was not taken under strict aseptic and antiseptic conditions as mentioned above were excluded.

Following the exclusion criteria mentioned, 81 of the 387 patients were excluded from the study, that is to say that 306 women were finally included in the study as they fulfilled all the requirements set. The three groups into which they were divided according to their gestational stage are as follow:

LESS THAN 28 WEEKS OF PREGNANCY: 94 cases (31%)

BETWEEN 28 AND 34 WEEKS OF PREGNANCY: 85 CASES (28%)

MORE THAN 34 WEEKS TO 37 WEEKS OF PREGNANCY: 127 CASOS (41%)

All patients were studied for special germs at the Hospital Lab and were treated with antibiotics (ATB) accordingly.

The ATB administered to the patients were:

AZITROMICINA 500 mg. a day for 5 days.

CLARITROMICINA 500 mg. every 8 hours for 8 days..

AMPI-SULBACTAM 750 mg. every 12 hours for 10 days, when culture was positive for streptococcus group B.

Culture results:

All the samples:	Results +	Results –	Other germs
CHLAMYDIA	306	37(12,09%) 12 (3,9%)	27 (8,8%)
MYCOPLASMA	306	34 (11,1%) 11 (3,5%)	23 (7,5%)
UREA PLASMA	306	106 (34,6%) 25 (8,16%)	31 (10,1%)

Among all the germs found we must highlight the presence of: Neisseria gonorrhea, gardnerella vaginalis, trichomonas vaginalis, candida albicans, streptococcus group B, anaerobia (Fusobacterium), Staphylococcus aureus.

Some considerations:

First of all we must highlight the strong relation between RPM and amnios infections. Although not all the cultures were positive, in our group of study there is a high rate of cases of urea plasma associated with RPM and a lower rate of cases associated with mycoplasma and chlamydia.

The urea plasma is the highest prevalence agent in our study.

Another relevant fact is that the mycoplasma was always found associated with other agents.

Conclusions:

Scientific evidence does not support systematic screening and treatment of all the asymptomatic pregnant women to avoid PP, except for those women who have a history of premature deliveries. However, we have implemented as a norm the systematic study of all patients with PMR through cultures and the corresponding treatment with ATB, and we are also suggesting other Departments to do the same.

REFERENCIAS

1. Kiss H, Preticevic L, Husslein P. Prospective randomised controlled trial of an infection screening programme to reduce the rate of preterm delivery. *BMJ*. 2004; 329:371.
2. Swadpanich U, Lumbiganon P, Prasertcharoensook W, Laopaiboon M. Programas de detección y tratamiento de infecciones del aparato genital inferior para la prevención del parto prematuro. En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2008; Número 2. Oxford: Update Software.
3. Aguilar MT, Manzanares S. Programas de screening. Prevención de la prematuridad. En: Bajo Arenas JM, Melchor Marcos JC, Mercé LT, editores. *Fundamentos de Obstetricia (SEGO)*. Madrid. 2007, pp 431-436.
4. Alger L, Pupkin M. Etiology of Preterm rupture of membranes. *Clin Obstet Gynecol* 29: 758, 1986.
5. Romero R, Yoon B, Mazor M et al. A comparative study of the diagnostic performance of amniotic fluid glucose, white blood cell count, interleukin 6 and gram stain in the detection of microbial invasion in patients with preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 839-51.
6. McGregor JA, French JI (1997): Evidence-based prevention of preterm birth and rupture of membranes: infection and inflammation. *J Soc Obstet Gynaecol Can*; 19:835-852.
7. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial de prevención y control de las infecciones de transmisión sexual: 2006 2015: romper la cadena de transmisión. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2007.
8. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin N° 80: premature rupture of membranes. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. ACOG Committee on Practice Bulletins-Obstetrics. *Obstet Gynecol*. 2007 Apr;109(4):1007-19.
9. Pararas, M., Skevaki, C., Kafetzis, D. Preterm birth due to maternal infection causative pathogens and modes of prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006. 25;562-569.

10. Taylor Robinson: "The role of mycoplasma in pregnancy outcome" Best practice and research clinical obstetrics and gynecology 21³ 428 – 438, Jun 2007.
11. José A. López Fernández "Candidiasis recurrentes y otras infecciones del Tracto genital inferior (clamidias, micoplasma, ureaplasma, Gardnerella) XX Congreso Anual de la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopía. Madrid 2008.

APORTES PARA LA OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DE LA INFECCIÓN POR HIV EN GRUPOS MAYORMENTE AFECTADOS POR LA EPIDEMIA: PRUEBA PILOTO PARA FUTURO ESTUDIO DE INTERVENCIÓN COMUNITARIA.

Dra. María de los Angeles Pando, Dra. María M. Avila,
Dr. Manuel Gomez Carrillo, Dr. Horacio Salomón.
Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS)
(ex Centro Nacional de Referencia para el Sida).
Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires

RESUMEN

Introducción

Estudios epidemiológicos realizados en la población de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) han revelado que la epidemia de HIV impacta de forma desproporcionada a este grupo encontrándose valores de prevalencia cercanos al 14% y de incidencia entre 4 y 6% personas/año (1-3). Estos indicadores revelan la necesidad urgente de implementar medidas de intervención a fin de bajar el impacto de la epidemia entre los HSH. En este sentido, la detección temprana de los casos de infección por HIV resulta indispensable aportando beneficios tanto a nivel individual como de salud pública. El diagnóstico de los pacientes durante la etapa de infección aguda facilita el abordaje temprano del mismo incorporándolo en regímenes de tratamiento y previniendo el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, la detección temprana de los casos de infección por HIV trae aparejado un importante impacto en salud pública. Las personas diagnosticadas tendrán la posibilidad de realizar consultas médicas específicas a fin de disminuir sus conductas de riesgo y prevenir futuras infecciones. La incorporación del tratamiento antirretroviral traerá dos consecuencias importantes, por un lado controlando la infección a nivel individual y previniendo el desarrollo de enfermedades oportunistas y por otro lado, al disminuir los valores de carga viral plasmática, se reduce la transmisibilidad y las futuras infecciones entre sus contactos⁴. Los altos valores de prevalencia e incidencia detectados en los HSH hacen suponer que existe un subgrupo de la población que a pesar de tener diagnósticos serológicos negativos, podría estar recientemente infectada y no ser diagnosticada

por los métodos utilizados de rutina, aun cuando los métodos de tamizaje incluyan técnicas de cuarta generación que detectan antígenos virales (5-7).

Los antecedentes presentados de alta prevalencia e incidencia de HIV entre los HSH en Buenos Aires, sumado a las experiencias de diagnóstico por detección de ácidos nucleídos realizadas en otros países, demuestran que la identificación de las infecciones agudas es crucial para limitar la diseminación de la infección por HIV entre los HSH. En este sentido, el objetivo general de este trabajo fue contribuir a la reducción en la transmisión del HIV a través de la optimización de las estrategias de diagnóstico de infección en subgrupos de la población altamente afectados por la epidemia. A tal fin el objetivo específico de este trabajo fue la identificación de casos de infección aguda por HIV a través de la implementación de técnicas diagnósticas directas en un grupo de HSH no diagnosticados por métodos serológicos convencionales.

Materiales y métodos

Se estudiaron muestras de participantes HSH provenientes de un estudio de corte transversal cuyo principal objetivo fue estimar la prevalencia e incidencia de HIV así como también el perfil de resistencia antirretroviral y la caracterización molecular de los individuos HIV positivos. Un total de 1549 HSH fueron incorporados al estudio, obteniéndose una prevalencia de infección por HIV del 10.4% (161/1549)³. Para los fines de este trabajo se seleccionaron tres grupos de muestras provenientes de dicho estudio: 1) participantes con diagnóstico HIV indeterminado (ELISA y/o AP reactivos y WB indeterminado); 2) participantes HIV negativos con tamizaje no reactivo (ELISA y AP no reactivos) y 3) participantes HIV negativos por WB con tamizaje reactivo (ELISA y/o AP reactivos y WB negativo). Todas las muestras de plasma se encontraban conservadas a -80°C. La carga viral plasmática se determinó mediante la cuantificación de copias de ARN-HIV-1/ml en plasma utilizando el método comercial VERSANT®HIV-1 RNA 3,0 ASSAY (bDNA) de Siemens. La medición de antígeno p24 se realizó con la técnica de ELISA (Vironostika HIV-1 Antigen de Biomerieux).

Resultados

Se seleccionaron todos los individuos HIV indeterminados por WB (N=14) y HIV negativos por WB con tamizaje reactivo (N=16). Por otro lado se seleccionó una muestra de 241 individuos HIV negativos con tamizaje no reactivo. Un 7.1% de las muestras HIV negativas con tamizaje reactivo

y un 23.1% de las muestras HIV indeterminadas por WB fueron reactivas para Agp24 y tuvieron carga viral plasmática >500.000 copias/ml. En total, un 14.8% de las muestras con resultados discordantes en las técnicas de tamizaje o con resultado indeterminado en el WB, fueron identificadas como HIV positivas utilizando diagnóstico directo. Con la identificación de 4 nuevos casos HIV positivos la prevalencia de HIV en el grupo de hombres que tienen sexo con hombres se incrementó en 0.3 puntos, de 10.4% (IC 95% 8.8-11.9) a 10.7% (IC 95% 9.1-12.2). Entre las 241 muestras HIV negativas con tamizaje no reactivo, no se detectaron muestras con valores de CV mayores a 200 copias/ml. Un total de 25 muestras tuvieron valores detectables de CV menores a 200 copias/ml.

Si bien no era un objetivo inicial del estudio, se recopiló información relacionada al seguimiento de los pacientes con resultados indeterminados y serodiscordantes para HIV. Del total de 16 pacientes HIV negativos con tamizaje reactivo (ELISA y/o AP reactivos y WB negativo), tres volvieron a realizarse el diagnóstico para HIV, resultando HIV negativos. El paciente que fue en este estudio diagnosticado como HIV positivo por técnicas de diagnóstico molecular (habiendo sido negativo en técnicas serológicas), no regresó al centro de testeo a realizarse un nuevo estudio. En relación a los 14 pacientes con resultados indeterminados, 12 (86%) volvieron a realizarse el estudio, resultando tres de ellos positivos para la infección por HIV (los tres diagnosticados como positivos en este estudio) y nueve fueron negativos para HIV.

Conclusiones

Los datos obtenidos en este estudio muestran que la utilización de métodos de diagnóstico directos que identifiquen ácidos nucleicos (Carga Viral plasmática) y/o proteínas (Agp24) virales podría ayudar a incrementar el diagnóstico temprano de infección por HIV, particularmente en grupos con alta prevalencia e incidencia de HIV como es la población de hombres que tienen sexo con hombres de Buenos Aires.

Estos resultados concuerdan con reportes de estudios internacionales realizados en HSH donde se encontró que un 0.3% (36/13677) de voluntarios que eran negativos por métodos indirectos de diagnóstico, fueron positivos para la infección por HIV cuando se utilizaron métodos de detección de ácidos nucleicos⁶. Por otro lado, un estudio realizado en la Ciudad de New York revela que el 81% de las infecciones agudas detectadas a través de la identificación de ácidos nucleicos virales, son de hombres que tienen sexo

con hombres, mostrando la importancia que la implementación de esta técnica tiene en particular en este grupo de la población. Este estudio también revela que sin la utilización de métodos directos de diagnóstico, un 9% de los diagnósticos de infección por HIV podrían haberse perdido⁸. En nuestro estudio, la identificación de cuatro nuevos casos positivos para la infección por HIV representa un incremento del 0.3% en la prevalencia de HIV en HSH de Buenos Aires.

Aun cuando no se había planificado como parte del estudio el seguimiento de los pacientes, un alto porcentaje de individuos con diagnóstico indeterminado por WB (86%) volvieron a realizarse el diagnóstico nuevamente, incluyendo los tres casos que fueron identificados como HIV positivos en este estudio. Sin embargo, esta tendencia no fue observada en los pacientes con diagnóstico negativo por WB, pero con resultados reactivos en los métodos de tamizaje, donde solo el 19% de los pacientes regresaron a un nuevo diagnóstico. Nuestros resultados sugieren que los médicos tratantes deberían dar la recomendación de un nuevo diagnóstico, no solo a los participantes con resultados indeterminados, sino también a aquellos que teniendo resultados negativos por WB hubieran sido reactivos por una o ambas técnicas de tamizaje. Esta recomendación sería de gran relevancia en particular en centros de testeo focalizados en los grupos con alta prevalencia e incidencia de infección por HIV, como los HSH.

Aun cuando en nuestro estudio no hemos obtenido casos de participantes con cargas virales mayores a 200 copias/ml entre los individuos previamente diagnosticados como negativos para HIV, la pequeña proporción de casos estudiados ($\approx 18\%$) no nos permite sacar conclusiones acerca de la ausencia de casos positivos. En este sentido, es necesario realizar estudios que impliquen un mayor número de casos, así como que prevean el seguimiento de los pacientes, en particular de aquellos que tengan resultados dudosos (por ejemplo, bajos niveles de cargas virales que no den una idea concluyente de infección).

En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que el algoritmo para el diagnóstico de infecciones tempranas debería incluir la detección de ácidos nucleicos en HSH tanto con resultados indeterminados por WB como aquellos que presentan resultados discordantes en las técnicas de tamizaje, aun cuando el diagnóstico por WB sea negativo. Finalmente los resultados aquí expuestos nos brindan las herramientas necesarias para el planteo de un proyecto prospectivo centrado no solo en la identificación de casos recientes de infección (por métodos directos), sino también que contemple la

inmediata intervención médica y comunitaria a fin de prevenir futuras transmisiones y brindar un adecuado control de la infección del paciente.

ABSTRACT

Background

In Argentina, HIV diagnosis in adults is made through one or two enzyme immunoassay tests and a confirmatory test¹. These strategies may ignore infected individuals during early primary infection (2-4), representing an important public health problem among groups with high HIV prevalence and incidence, such as men who have sex with men (MSM) (6.3% persons/year) (5-6). The general objective of this study was to contribute to reducing HIV transmission among MSM through the identification of antibody-negative, nucleic acid-positive individuals.

Findings

A total of 1,549 MSM were recruited in an HIV seroprevalence study⁶. A total of 161 (10.4%) MSM were HIV-positive and 14 (0.9%) indeterminate. Among the 1,374 negative individuals, 16 (1.2%) exhibited reactive results in the screening assay. Indeterminate-WB (Western Blot) samples and negative-WB samples (with discordant results in the screening) were analyzed to detect HIV nucleic acid by viral load testing. Up to 23.1% HIV- indeterminate-WB samples and 7.1% HIV-negative-WB samples with discordant results in the screening assays had detectable nucleic acid. Overall, 14.8% of the samples with discordant or indeterminate results were identified as HIV-positive using direct diagnosis. With the identification of four new cases using nucleic acid detection test, HIV prevalence in MSM increased by 0.3 percent (from 10.4% to 10.7%).

Conclusions

In line with previous reports (7-9), results from this study suggest the importance of including nucleic acid detection in HIV algorithm for those HIV-indeterminate-WB and HIV-negative-WB MSM with discordant results in the screening assays in order to decrease HIV transmission among this population with high HIV prevalence and incidence.

REFERENCIAS

1. Pando MA, Maulen S, Weissenbacher M, et al. High human immunodeficiency virus type 1 seroprevalence in men who have sex with men in Buenos Aires, Argentina: risk factors for infection. *Int J Epidemiol*. 2003;32:735-740.
2. Segura M, Sosa Estani S, Marone R, et al. Buenos Aires cohort of men who have sex with men: prevalence, incidence, risk factors, and molecular genotyping of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23:1322-1329.
3. Pando MA, Gómez-Carrillo M, Vignoles M, et al. Incidence of HIV-1 infection, antiretroviral drug resistance and molecular characterization in newly diagnosed individuals in Argentina. A Global Fund Project. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2011;27(1):17-23.
4. Montaner JS. Treatment as prevention--a double hat-trick. *Lancet*. 2011 Jul 16;378(9787):208-9.
5. Zou S, Dorsey KA, Notari EP, et al. Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing. *Transfusion*. 2010 Jul;50(7):1495-504.
6. Stekler JD, Swenson PD, Coombs RW, et al. HIV testing in a high-incidence population: is antibody testing alone good enough? *Clin Infect Dis* 2009;49:444-53.
7. Ananworanich J, Phanuphak N, de Souza M, et al. Incidence and characterization of acute HIV-1 infection in a high-risk Thai population. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;49:151-5.
8. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. Acute HIV infection - New York City, 2008. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2009;58:1296-9.

EVALUACIÓN DE FACTORES PRONÓSTICO ADICIONALES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Dra. María José Rico, Dra. Viviana R Rozados, Dr. Carlos M Alasino, Dra.
O Graciela Scharovsky, Alumna Cintia Herrera
Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad
Nacional de Rosario.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud mundial. Mientras que muchas enfermedades infecciosas son eliminadas, las enfermedades neoplásicas continúan siendo las más importantes causas de muerte y discapacidad en el mundo, debido al envejecimiento de la población. Se estima que se producen alrededor de 1200000 nuevos casos de cáncer de mama por año en el mundo, lo que implica mas de 500000 muertes anuales¹ La Argentina es el segundo país con mayor tasa de mortalidad por cáncer en el continente. En el año 2009, murieron 60117 personas debido al cáncer, de los cuales el 95,79% de los casos se debió a tumores malignos, el 4,2% se debió a carcinomas *in situ*, tumores benignos, de comportamiento incierto o desconocido. Del total de las muertes por cáncer, el 9,09% de los casos se debió a cáncer de mama².

Las células T reguladoras (Treg) son células CD4⁺ que inhiben *in vivo* respuestas inmunes exacerbadas. Se generan en el timo durante el desarrollo fetal y neonatal de las células T. Estas células están presentes en los individuos normales y llevan a cabo su función reguladora durante la vigilancia normal de los autoantígenos³. En pacientes con diferentes tipos de tumores se ha reportado un número aumentado de Treg en el sitio del tumor, en los nódulos linfáticos drenantes o en circulación (4-10). Se demostró el rol negativo de las Treg entre los linfocitos T infiltrantes del tumor, observando una correlación inversa entre la infiltración de Tregs y la supervivencia global en el carcinoma de ovario¹¹ En otros trabajos se encontró una relación y significativa entre la expresión de HER-2 y el número de Tregs¹²

OBJETIVOS

Analizar el infiltrado linfocitario y la expresión de las moléculas CD4 y CD8, CD34 (marcador endotelial) y Foxp3 (marcador Treg) en tumores primarios de pacientes con cáncer de mama

Relacionar la expresión de las moléculas estudiadas, con la evolución clínica de las mismas a los 5 años del tratamiento primario.

Muestras

Se utilizaron muestras de archivo de tumores primarios, incluidos en parafina, de pacientes con cáncer de mama, estadios I y II (N=27).

Determinación del Infiltrado linfocitario

Las secciones histológicas de los tumores de mama fueron desparafinadas y teñidas usando hematoxilina-eosina. La intensidad del infiltrado linfocitario fue calculada en 20 campos de áreas calientes (*hot spots*) con una magnificación de 400X. Se evaluó el infiltrado linfocitario de manera semicuantitativa usando el siguiente *score*: 0 (nulo), 2 (bajo), 4 (moderado) y 6 (alto).

Determinaciones inmunohistoquímicas

Los preparados histológicos de 5µm de espesor fueron desparafinados. Posteriormente se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena usando H₂O₂ y las reacciones no específicas con suero normal. Luego los preparados fueron incubados toda la noche a 4°C con el anticuerpo correspondiente.

Células Tregs. Los preparados fueron incubados con el anticuerpo anti-Foxp3 (eBioscience) en una dilución de 1:25.

Células CD34⁺. Se utilizó el anticuerpo anti-CD34 (BD Pharmingen) en una dilución de 1:40

Linfocitos CD4⁺ Se utilizó el anticuerpo anti-CD4 (Leica Microsystems) en una dilución de 1:50.

Linfocitos CD8⁺ Se utilizó el anticuerpo anti-CD8 (Leica Microsystems) en una dilución de 1:50.

Para el revelado se utilizó el kit Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, USA). Las secciones fueron visualizadas con 3,3'-diaminobenzidina (Sigma) como cromógeno y contrateñidas con Verde de Metilo. La cuantificación se realizó de la misma forma que para el infiltrado linfocitario.

Microscopía confocal

Se determinó la presencia de células T reguladoras y linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en cortes histológicos usando FITC-anti-CD4 (BD Pharmingen), PE-Cy5 anti-CD25 (BD Pharmingen) y PE-anti-Foxp3 (BD Pharmingen) y Alexa Fluor 488-anti CD4 (Invitrogen) y Alexa Fluor 488-anti CD8 (Invitrogen). Estas muestras fueron luego analizadas en microscopio confocal (Nikon Modelo Eclipse TE-2000-E2).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Características clínico-patológicas de las pacientes

En la Tabla I se describen las características clínico-patológicas de las pacientes en la que se muestra edad, estadio tumoral, descripción histológica, estado de los receptores hormonales y de Her2/neu y, por último, la respuesta que tuvieron al tratamiento luego de 5 años de la cirugía.

Las pacientes cuyos tumores fueron analizados, llevaron a cabo diferentes tratamientos. Todas fueron sometidas a cirugía, luego recibieron distintos tratamientos de quimioterapia o terapia adyuvante: ACx4, ACx4 y paclitaxel, ciclofosfamida-doxorrubicina x 6, ciclofosfamida-doxorrubicina x 4, tamoxifeno, anastrozol. (Tabla 1)

Infiltrado linfocitario

La infiltración linfocitaria intra y peritumoral es común en diferentes tumores humanos; se observa en el carcinoma ductal *in situ* hereditario y en el carcinoma ductal infiltrante. Aunque la función exacta del infiltrado linfocitario de los carcinomas primarios no se ha aclarado, existe evidencia que en algunos tipos de cáncer, como los de cavidad oral, pulmón, estómago y en los melanomas malignos, la intensidad del infiltrado inflamatorio peri-tumoral se relaciona con un buen pronóstico de la enfermedad (13,14). (Figura 1)

Tabla I. Características clínico –patológicas de las pacientes

Paciente	Edad	Estadio	Histología	RE	RP	Her2/neu	Evolución
1	52	II	Car Ductal	-	-	+	LE
2	66	II	Car Ductal	+	-	-	R
3	66	I	Car Ductal inf	+	+	-	LE
4	57	II	Car Ductal	+	+	-	LE
5	41	II	Car Ductal	+	+	-	LE
6	39	II	Car Ductal	+	+	+	LE
7	66	II	Car Ductal inf	+	+	-	LE
8	66	II	Car Ductal inf	+	-	-	LE
9	49	II	Car Ductal	+	+	-	LE
10	66	II	Car Ductal inf	+	-	-	LE
11	39	I	Car Ductal inf	+	+	+	LE
12	47	II	Car Ductal	-	-	+	LE
13	60	II	Car Ductal	+	+	-	LE
14	56	II	Car Ductal	+	+	+	R
15	42	II	Car Ductal in situ	-	-	+	LE
16	44	II	Lobullar invasor	-	-	-	LE
17	36	II	Car Ductal inf	-	-	+	LE
18	54	II	Car Ductal inf	+	-	-	LE
19	58	II	Car Ductal inf	-	-	+	LE
20	53	II	Car Ductal inf	-	-	-	R
21	57	II	Car Ductal	-	+	-	LE
22	62	II	Car Ductal inf	+	-	+	LE
23	59	II	Car Ductal	+	+	+	LE
24	60	II	Car Ductal	+	+	-	LE
25	58	II	Car Ductal	+	+	+	R
26	60	III	Car Ductal	+	-	-	LE
27	57	II	Car Ductal	-	+	-	R

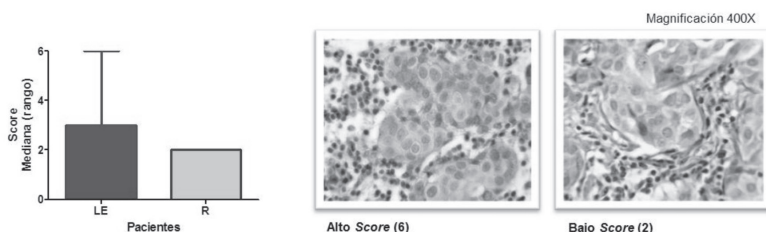
RE: Receptores de Estrógenos; RP: Receptores de Progesterona

LE: Libre de enfermedad (5 o más años); R: Recaídas

En la Figura 1 está graficado el *score* correspondiente a los dos grupos de pacientes: Libres de enfermedad (LE) y Recaídas (R), estudiadas durante este trabajo. Las microfotografías corresponden a las tinciones con hematoxilina-eosina de un corte representativo de un paciente con alto y bajo *score*, respectivamente, en donde se observa el infiltrado linfocitario. La intensidad del infiltrado linfocitario (mediana [rango]) en los tumores primarios de las pacientes LE (3 [0-6]) fue moderada y significativamente mayor ($p<0,05$)

que la de las pacientes R (2 [0-2]). Esta diferencia podría reflejar la participación de la respuesta inmune antitumoral del huésped en el resultado clínico obtenido. De confirmarse este resultado con un mayor número de pacientes, el infiltrado linfocitario observado en el área del tumor primario podría ser propuesto para ser utilizado como un factor pronóstico.

Figura 1

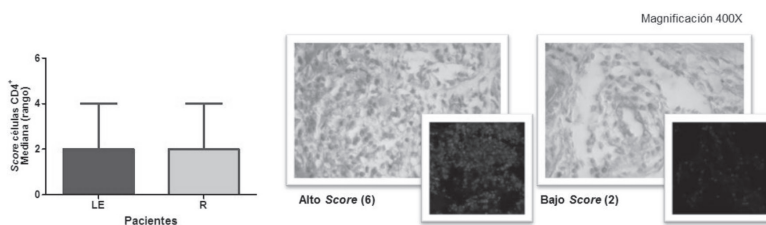


Linfocitos CD4⁺

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en cuanto a la intensidad del infiltrado linfocitario en los dos grupos de pacientes, nos interesó estudiar algunas de las moléculas que identifican diferentes poblaciones linfocitarias.

En la Figura 2 se muestran los resultados de la cuantificación de las células CD4⁺. Como se puede observar en el gráfico, ambos grupos de pacientes mostraron un valor mediano similar, presentando una gran variabilidad en el *score* obtenido. Se muestran microfotografías ejemplificando los valores altos y bajos de densidad de células positivas y en los correspondientes insertos las tinciones de los linfocitos CD4⁺ observadas en el microscopio confocal.

Figura 2

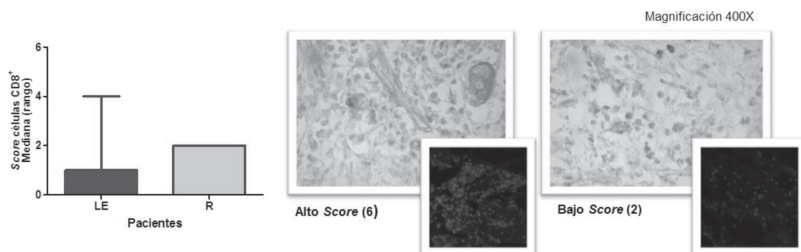


Linfocitos CD8⁺

Algunos autores han propuesto que la presencia en los tumores de linfocitos CD8⁺ podría predecir la respuesta clínica en pacientes con cáncer de mama (15), como así también la recurrencia de tumores y la supervivencia de pacientes con cáncer de colon (16). Teniendo en cuenta dicha propuesta investigamos la presencia de los linfocitos CD8⁺ en las muestras de las pacientes estudiadas.

En la Figura 3 se muestra el *score* obtenido para la determinación de los linfocitos CD8⁺. Como puede verse, la presencia de linfocitos fue muy variable en el grupo de pacientes LE y la mediana que cuantifica la densidad intratumoral de dichas células, contrariamente a lo esperado, fue mayor en el grupo de pacientes R, aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa. Se muestran las tinciones de CD8 vistas al microscopio óptico y con el microscopio confocal, en cortes que presentaron alto y bajo *score*.

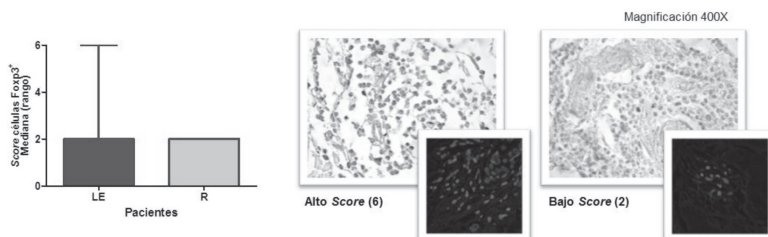
Figura 3



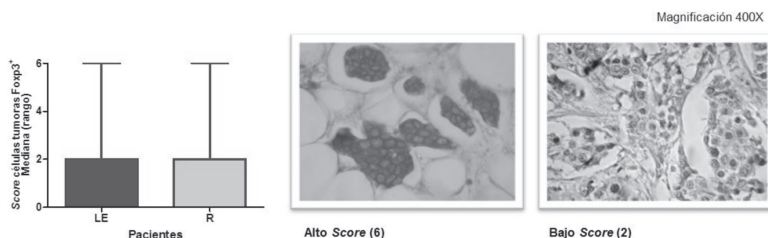
Linfocitos Foxp3⁺

En distintos modelos tumorales se ha visto que la densidad de células Tregs, evaluadas con el marcador Foxp3 puede tener un importante valor pronóstico (17,18).

En la Figura 4 se grafica la densidad de células reguladoras Foxp3⁺ (células Tregs) que se encontraron dentro del infiltrado tumoral linfocitario. La presencia de linfocitos Foxp3⁺ fue muy variable, desde nula a alta, y no estuvo relacionada con la respuesta al tratamiento en el periodo analizado. Se muestran las tinciones correspondientes a la determinación de Tregs en microscopio óptico y en microscopio confocal.

Figura 4**Células tumorales Foxp3+**

Algunos estudios han demostrado que las células tumorales pueden expresar la molécula Foxp3 y que esta expresión podría estar asociada a un buen pronóstico o a una mayor supervivencia (19,20). La evaluación en nuestras muestras de la proporción de células tumorales Foxp3+, mostró mucha variación entre las muestras estudiadas (Figura 5); dentro de cada grupo sin detectarse diferencias entre grupos. Un mayor número de muestras de diferentes tipos de tumores de mama podría permitir entender la función, durante la evolución del tumor, que tendría la expresión de Foxp3 en la célula tumoral. Se muestran ejemplos de las tinciones correspondientes en microscopio óptico y en microscopio confocal.

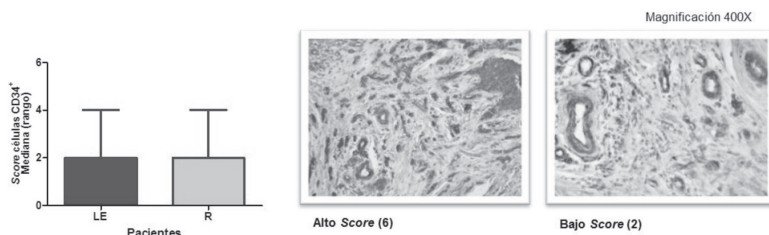
Figura 5**Células CD34+**

La angiogénesis cumple un rol importante, tanto en el crecimiento tumoral como en el desarrollo de metástasis, y es regulada por un balance entre factores angiogénicos y anti-angiogénicos (21,22). Es por esto que resultó

interesante evaluar la densidad de la microvasculatura a través de la determinación de las células CD34⁺.

En la Figura 6 puede verse que la densidad vascular fue baja en los dos grupos de pacientes analizados, sin observarse asociación alguna con la evolución clínica. Se muestran ejemplos de las tinciones correspondientes a una muestra con alta y una con baja densidad de vasos sanguíneos en microscopio óptico.

Figura 6



CONCLUSIONES

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento respecto al papel que juega el sistema inmune en la evolución tumoral. Existen muchos ejemplos en la bibliografía que describen cómo el sistema inmune es capaz de reconocer los antígenos tumorales y eliminar o controlar el crecimiento de las células tumorales. También ha sido posible manipular el sistema inmune de manera de generar respuestas inmunes específicas del tumor.

El perfil de la respuesta inmune resulta muy importante en el desarrollo de nuevas terapias. Sin embargo un tema que todavía queda sin resolver es el hecho que cuando se evalúan las respuestas inmunes específicas del tumor luego de una inmunoterapia, las respuestas no siempre se correlacionan con la regresión tumoral clínicamente probada. Sería muy importante conocer el balance entre los factores inmunoestimuladores e inmunosupresores del sistema inmune. De esta manera se podría realizar un mejor análisis de la eficacia de un determinado protocolo. Sin embargo, los datos obtenidos hasta el momento por nosotros y por otros autores todavía resultan controversiales. La información que figura en la bibliografía en su mayoría todavía se encuen-

tra limitada a la inmunidad sistémica en sangre periférica. Sin embargo, para la erradicación del tumor, las células circulantes efectoras tienen que infiltrar el tumor. En la clínica resulta bastante difícil seguir este proceso y la evaluación de la respuesta inmune *in situ* constituye un importante desafío todavía.

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido concluir que la presencia de un intenso infiltrado linfocitario intratumoral podría ser un marcador pronóstico de buena respuesta al tratamiento en los primeros 5 años luego de la cirugía, mientras que no se encontró relación entre el grado de positividad para las otras moléculas estudiadas y la evolución de la enfermedad. En el futuro será necesario incorporar un mayor número de muestras para poder analizar si existen asociaciones con las distintas características de los tumores estudiados, y de esta manera poder usarlo en el diagnóstico clínico.

ABSTRACT

The aim of our work was to analyze the lymphocytic infiltrate and the expression of CD4, CD8, CD34 and Foxp3 in primary tumors of breast cancer patients, and to relate them with clinical evolution (disease free: DF or relapsed: R) after 5 years from the surgery. There were analyzed archive samples of ductal mammary tumors (n=27), (stages I and II). The expression of CD4 and CD8 lymphocytes was determined by immunohistochemistry (IHC) and confirmed by confocal microscopy. The expression of Foxp3 in lymphocytes and tumor cells and CD34 in endothelial cells was evaluated by IHC. The lymphocytic infiltrate was assessed in histological sections stained with hematoxylin-eosin. The quantification was done in 20 high magnification fields and a score ranging from 0 to 6 was utilized. In DF patients (n=22) the intratumoral lymphocytic infiltrate was more intense than that of R patients (P=0.05). For CD4, CD8, CD34 and Foxp3 molecules no differences between groups of patients were observed. In conclusion, the presence of an intense intratumoral lymphocytic infiltrate could be a prognostic marker of good response to treatment in the first 5 years after surgery.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, et al. International Agency for Research on Cancer. 2008
2. Ministerio de Salud,, Vol. 131: 7-10. Buenos Aires, República Argentina: ministerio de salud de la Nación.
3. Bluestone JA, et al. Nat Rev Immunol 3:253, 2003.
4. Kono K, et al. Cancer Immunol Immunother 55:1064, 2006.
5. Awwad M, et al. Cancer Res 49:1649, 1989.
6. O'Garra A, et al. Nat Med 10:801, 2004.
7. Browder T, et al. Cancer Res 60:1878, 2000.
8. Curiel TJ, et al. Nat Med 10:942, 2004.
9. Mancuso P, et al. Blood 108:452, 2006.
10. Bevilacqua P, et al. Breast Cancer Res Treat 36:205, 1995.
11. Curiel TJ, et al. Nat Med 10:942, 2004.
12. Bates GJ, et al. J Clin Oncol 24:5373, 2006.
13. Pagès F, et al. J Clin Oncol 27:5944, 2009.
14. Mahmoud SM, et al. Breast Cancer Res Treat 127:99, 2011.
15. Mahmoud SM, et al. J Clin Oncol. 29(15):1949, 2011.
16. Pagès F, et al. J Clin Oncol 27:5944, 2009.
17. Salama P, et al. J Clin Oncol 27:186, 2009.
18. Ménétrier-Caux C, et al. Cancer Res 69:7895-7898, 2009.
19. Ladoire S, et al. Breast Cancer Res Treat 125:65, 2011.
20. Karanikas V, et al. J Transl Med 6:19, 2008.
21. Zhou D, et al. J Cancer Res Clin Oncol 136:1719–1727, 2010
22. Mohammed RA, et al. Breast Cancer Res Treat 113:261, 2009.

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE FLÚOR EN AGUAS DE CONSUMO DE LA PROVINCIA DE SANTA FE. RELACIÓN CON LA SALUD DENTAL Y EL RIESGO DE FLUOROSIS.

Maela Lupo, Hilda S Moreno, Cristina Aguirre, Mirta Armendariz,
Alfredo Rigalli

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas.
Universidad Nacional de Rosario.

INTRODUCCIÓN

El flúor (F) es un elemento de aplicación en la industria y en salud se lo emplea para el tratamiento de la osteoporosis [1] y en la prevención de caries dentales [2]. La utilización de aguas fluoradas es materia de discusión, ya que la ingesta de F por esta vía sumada a otras puede conducir a cuadros de fluorosis [3]. Actualmente la exposición al F proveniente de otras fuentes está aumentada: uso de pesticidas [4], pulido de pisos [5], conservación de maderas [6], preparación de papeles, alfombras y artículos textiles. Los fertilizantes con fosfato pueden contener hasta un 5% de F [7]. Los efectos tóxicos son dosis dependiente y están relacionados fundamentalmente a los niveles que el F alcanza en el plasma y los tejidos.

Por lo expuesto, es previsible observar un incremento de la exposición al F por parte de la población como así también la aparición de fluorosis y sus complicaciones, tanto en humanos como en ganado criado en estas zonas o en animales silvestres.

Se han realizado en la Argentina otros estudios, uno en la provincia de Buenos Aires [8] y otro en el Chaco [9]. En este estudio se evalúa la Provincia de Santa Fe y se describe una “macrovariación” y una “microvariación”. En la macrovariación espacial y temporal se evalúa la distribución de la concentración de flúor en agua de zonas distantes a más de 10 km y se las compara con los valores que tenía cada zona en el año 1945. Por otra parte se ha realizado un estudio de “microvariación espacial y temporal”, que implica comparar la concentración de flúor en pozos distantes a no más de 500 m en un mismo momento y a la comparación de las concentraciones de flúor en el agua de un dado pozo a lo largo de un mes.

Además se tuvo como objetivo obtener información sobre el acceso de las poblaciones a aguas seguras en lo referente al contenido de flúor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron muestras de agua de diferentes regiones de la provincia de Santa Fe, de diferentes orígenes: de pozo, de red con agua potabilizada y de ósmosis inversa. En las muestras de aguas se determinó la concentración de fluoruro como se indica más abajo.

Se recolectaron muestras de tierra urbanas y rurales de zonas cercanas a los pozos investigados. En tierras se determinó fluoruro y flúor total.

Determinación de fluoruro por potenciometría directa: La medición de la concentración de fluoruro en agua se realizaron por potenciometría directa utilizando un electrodo de ión específico ORION 94-09 [10]. Los resultados se expresaron en mg/l= ppm (partes por millón)

Determinación de flúor total: La medición de la concentración de flúor en tierras se realizó por potenciometría directa utilizando un electrodo de ion específico ORION 94-09 luego de realizar una destilación isotérmica [10]. El contenido de flúor se expresó en mg/Kg = ppm (partes por millón).

Coordenadas geográficas: la posición de los diferentes sitios de muestreo, cuando se requirió, se obtuvo a través de herramientas informáticas que involucran sistemas de posicionamiento global (GPS).

Análisis estadísticos: La distribución de frecuencias de los diferentes valores de concentración de flúor en tierras y en aguas se realizó con el test de Kolmogorov-Smirnov. Dado que las poblaciones no tuvieron distribución normal, cuando se compararon dos muestras de datos independientes se utilizó el test de Mann-Whitney. El test de Kruskal Wallis con post test de Dunn se utilizó para comparar mas de dos muestras de datos independientes. El test de Wilcoxon se utilizó cuando dos muestras de datos fueron dependientes. La correlación de pares de datos se realizó con test de correlación de Spearman. Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0.05$. Los resultados se expresan como mediana (mínimo valor– máximo valor/ numero de datos). Cuando se utilizan gráficas del tipo “box and whiskers” se representa la mediana, percentilos 25 y 75% y rango.

RESULTADOS

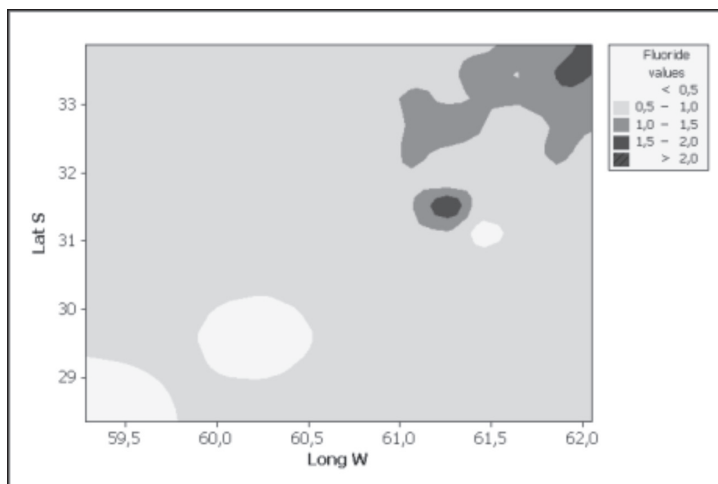
Distribución de frecuencias de contenido de fluoruro en agua y tierra

El análisis de la distribución de frecuencias del contenido de flúor en agua y tierras mostró que en ambos casos la misma no tuvo distribución normal (Test de Kolmogorov Smirnov, $p < 0.05$). En agua de pozo el valor máximo hallado fue de 4.71 ppm, que supera varias veces el contenido de flúor en agua para consumo. (Ilustración 1). En el caso de tierras el valor mas alto fue 82.8 ppm. No existe información sobre la concentración de flúor en tierras de la provincia. El tema será motivo de estudio de próximos proyectos en los que se investigará el efecto del flúor en tierra sobre el crecimiento de especies cultivables en la provincia.

Macro-variación espacial

La Error: No se encuentra la fuente de referencia muestra la concentración de fluoruro en aguas de la provincia de Santa Fe en función de sus coordenadas geográficas. Se distinguen fácilmente dos zonas de concentraciones superiores a las recomendadas por la Organización Mundial de la Salud. Estas zonas corresponden a la zona central y a la zona sud-oeste

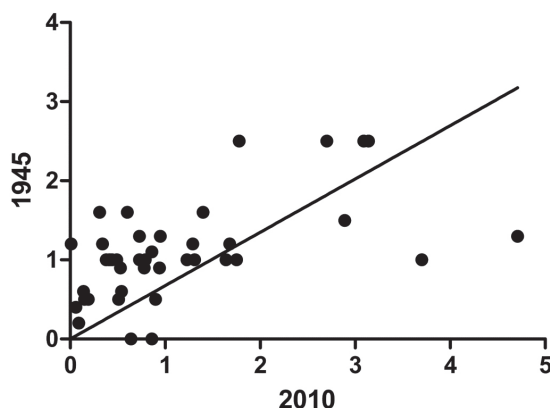
Ilustración 1: Concentración de fluoruro en la provincia de Santa Fe en función de la longitud (long W) y de la latitud (Lat S). La intensidad del tono representa rangos de concentración de flúor. Color negro > 2 ppm, blanco < 0.5 ppm.



Macro-variación temporal

La Ilustración 2 muestra los datos de concentración de fluoruro en localidades de la provincia de Santa Fe, relevado por Obras Sanitarias de la Nación en el año 1945 y por nuestro laboratorio en el año 2010.

Ilustración 2: Concentración de fluoruro en aguas de pozo en 1945 en función de la concentración en las mismas localidades en el año 2010. Los resultados se expresan en ppm. La línea corresponde a la regresión lineal entre los datos.

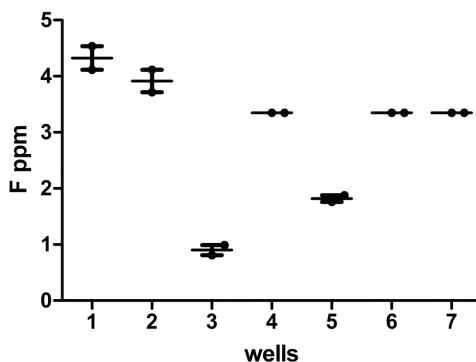


La regresión lineal refleja un aumento de la concentración de flúor en 2010, con respecto a los valores de 1945. La correlación de Spearman fue significativa ($r = 0.488$ $p < 0.05$) y la pendiente de la recta de regresión (0.6738 ± 0.072) fue significativamente menor que 1.

Micro-variación espacial

En diferentes localidades se muestrearon más de un pozo, hallándose estos a menos de 500 m uno del otro. Las localidades analizadas fueron Venado Tuerto (lat 33,71°, long 61,96°, 7 pozos analizados, Pueblo Ester ((lat 33,08°, long 60,56°, 3 pozos analizados,) y Carlos Pellegrini (lat 32,05°, long 61,78°, 3 pozos analizados). A modo de ejemplo se muestran los valores hallados en Venado Tuerto (Ilustración 3). La concentración de fluoruro de los diferentes pozos fueron significativamente diferentes (prueba de Kruskal Wallis test $p < 0.05$).

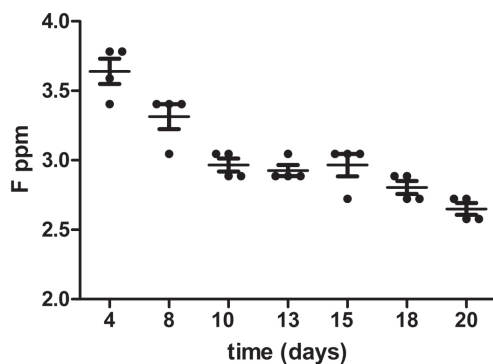
Ilustración 3: Concentración de fluoruro en diferentes pozos de la localidad de Vena-do Tuerto. Las muestras fueron obtenidas en el lapso de 1 hora en pozos que no distaban más de 500 m.



Micro-variación temporal

La Ilustración 4 muestra la concentración de fluoruro en agua de un pozo de la localidad de Carcarañá en el lapso de 20 días. Se observa una clara variación en la concentración de flúor a lo largo del tiempo.

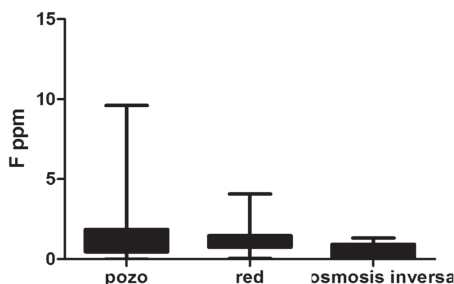
Ilustración 4: concentración de flúor en agua de un pozo de la localidad de Carcarañá



Análisis del contenido de flúor en diferentes fuentes de agua

Se analizaron aguas de pozos de diferentes localidades, el contenido de fluoruro en agua de red y proveniente de plantas de ósmosis inversa. La Ilustración 5 muestra los resultados obtenidos, demostrándose que los esfuerzos realizados para la provisión de agua con contenido adecuado de fluoruro han sido exitosos. Se puede observar una franca disminución de los límites mayores del rango y la mediana de cada grupo, en el agua de red y más aun en el caso de las plantas de ósmosis inversa.

Ilustración 5: Concentración de fluoruro en aguas de pozo, corriente de red y provenientes de plantas de ósmosis inversa de diferentes localidades de la provincia de Santa Fe.



Kruskal-Wallis test	
P value	0.0343
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	6.744

Concentración de flúor en tierras.

El contenido de flúor en tierras mostró un valor significativamente mayor en áreas rurales: 7.67 ppm (0.01-32.00/ 84) que en urbanas: 5.9 ppm (0.01-82.8/ 101).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la ejecución de este proyecto muestran que existen zonas de la provincia de Santa Fe donde el agua de pozo contiene

contenidos de flúor mayor que lo permitido por la WHO. Por otra parte el contenido de flúor en aguas de pozo ha aumentado en las últimas 7 décadas. En análisis del contenido de flúor en tierras demostró que las zonas rurales contiene más flúor que las zonas urbanas, podría pensarse que el uso de productos agro-químicos podría estar agregando este elemento a la tierra y a su vez ser esto la causa del incremento de flúor en aguas de pozo.

Los esfuerzos de las autoridades por proveer a la población con agua de mejor calidad ha quedado reflejado en la comparación del contenido de flúor de las aguas de pozo con las aguas potables de red y las provenientes de plantas de ósmosis inversa.

Un dato llamativo de este trabajo, no descrito anteriormente es la micro-variación en la concentración de flúor. Por un lado hemos demostrado que pozos distantes pocos metros entre si pueden tener contenidos de flúor muy diferente. Este estudio se hizo en tres localidades cuyos datos se consideraron son representativos de otros sitios. Se hallaron diferencias de hasta 4 veces en la concentración de fluoruro entre pozos distantes a menos de 500 m. Algunos de ellos con contenido normal y otros con aguas que podrían producir fluorosis. Otro hallazgo es la micro-variación temporal. El estudio llevado a cabo durante 20 días en un solo pozo de la localidad de Carcaraña demostró que el contenido de fluoruro del agua puede variar, en este caso hasta 1 ppm.

Los últimos resultados descriptos indican que para tener un conocimiento sobre una zona en lo referente al contenido de flúor se deberían muestrear un número importante de pozos, distribuidos en toda la zona y por otra parte obtener muestras a lo largo del tiempo.

Dado el bajo costo de la determinación de flúor se aconseja determinar el contenido de fluoruro del agua de cada pozo y como mínimo en 5 días espaciados durante 1 mes.

ABSTRACT

The upper limit of fluoride concentration in water for human consumption is 1.5 ppm. A great amount of studies have been carried out concerning the water fluoride concentration in wide areas around the world, but none have studied the change of fluoride concentration as a function of geographical coordinates and through time. This work describes "microvariation" of fluoride concentration among wells separated by meters and from which sampling

was done in little difference of hours. On the other hand, a "macrovariation" is also studied, describing changes among cities through decades and separated by hundreds kilometres.

Fluoride concentration was measured in Santa Fe province. Samples of soils and well water were collected from different regions separated at least by 10 km, and compared with fluoride concentrations measured 70 years ago. In each region three or more specific areas, separated by less than 500 m were sampled at different times. Differences in fluoride concentration in well water among regions were found, as well as an increase in fluoride concentration during 7 decades. Daily water fluoride concentration in a specific area displayed a great variation in the measurements through time. In addition, wells with no more than 500 m of separation were measured at the same time and were significantly different. These results indicate that in order to determine the fluoride concentration of a region, different samples of the same area should be obtained and a sampling through time should also be done.

REFERENCIAS

1. Vestergaard P, Jorgensen NR, Schwarz P, Mosekilde L. 2008. Effects of treatment with fluoride on bone mineral density and fracture risk--a meta-analysis. *Osteoporos Int* 19(3):257-68.
2. Stephen KW. 1994. Fluoride toothpastes, rinses, and tablets. *Adv Dent Res* 8:185-189.
3. Burgstahler A, Limeback H. 2004. Retreat of the fluoride fluoridation paradigm. *Fluoride* 37(4): 239-242.
4. Whitford GM. 1996. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci* Edited by H.M. Myers S. Karger, Basel, Switzerland. 16:1-153.
5. Raikhlin-Eisenkraft B, Nutenko I, Kniznik D, Merzel J, Lev A. 1994. Death from fluorosilicate in floor polish. *Harefuah* 126(5):258-259.
6. Wiese J, Klug E. 1989. Poisoning with a wood preservative. *Beitr Gerichtl Med* 47:103-106.
7. Loganathan P, Hedley MJ, Wallace GC, Roberts AH. 2001. Fluoride accumulation in pasture forages and soils following long-term applications of phosphorus fertilisers. *Environ Pollut* 115(2):275-82.
8. Paoloni JD, Fiorentino CE, Sequeira ME. 2003. Fluoride contamination of aquifers in the southeast subhumid pampa, Argentina. *Environ Toxicol* 18(5):317
9. Blanes PS, Buchhamer EE, Giménez MC. 2011. Natural contamination with arsenic and other trace elements in groundwater of the Central-West region of Chaco, Argentina. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 46(11):1197-206.

10. Rigalli A, Pera LI, Di Loreto V, Brun LR. 2007. Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. 1° Ed. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Argentina.
11. Fawell K, Bailey J, Chilton E, Dahi L, Fewtrell and Y. Magara. 2006. Fluoride in drinking water. World health organization. IWA Publishing, Alliance House, London.

ESTUDIO DEL PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE LEVADURAS DEL GÉNERO *MALASSEZIA* ASOCIADAS A AFECCIONES DÉRMICAS

Florencia Dinorah Rojas; Gustavo Emilio Giusiano
Departamento de Micología, Instituto de Medicina Regional
Universidad Nacional del Nordeste.

INTRODUCCIÓN

Los organismos del género *Malassezia* han sido reconocidos como miembros de la biota cutánea normal del hombre y los animales. Una de las características de estas levaduras es que todas son lipofílicas y la mayoría de ellas lípido-dependiente debido a un defecto en la capacidad de sintetizar ácidos grasos saturados. Por esta razón, prevalecen en la piel en áreas del cuerpo ricas en glándulas sebáceas.¹⁻⁵

Actualmente, el género incluye las siguientes especies: *Malassezia furfur* (*M. furfur*), *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. obtusa*, *M. slooffiae*, *M. pachydermatis*, *M. yamatoensis*, *M. dermatis*, *M. nana* y *M. japónica*.⁶⁻¹⁰ *M. equi* ha sido tentativamente nombrada pero no formalmente caracterizada.¹¹ En 2007, *M. caprae* y *M. equina*, aisladas de animales, fueron postuladas como nuevas especies.

Malassezia spp. ha adquirido importancia como patógeno emergente debido a su capacidad de producir infecciones superficiales y sistémicas, tanto en hospedadores inmunocomprometidos como inmunocompetentes.

Los estrictos requerimientos nutricionales de *Malassezia* complican su estudio de sensibilidad. La CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)¹³, estandarizó un método de sensibilidad (documento M27-A3) aplicable sólo para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de especies del género *Candida* y *Cryptococcus neoformans*. A fin de estudiar la sensibilidad *in vitro* de *Malassezia*, se ensayaron diversas técnicas utilizando medios de cultivos sólidos y líquidos. Pero estos resultados no están referidos a una técnica de referencia y hace difícil establecer una conclusión de valor sobre cuál es la actividad *in vitro* de esas drogas frente a las distintas especies del género y que esos resultados tengan relevancia clínica.¹³⁻¹⁷

El objetivo fue introducir modificaciones a la técnica de referencia de la CLSI para su aplicación al estudio de sensibilidad antifúngica de especies de *Malassezia* frente a los antifúngicos de uso clínico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 72 cepas de *Malassezia spp.* depositadas en el cepario del Departamento de Micología del Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste (Argentina) previamente tipificadas por de PCR-RFLP.¹⁸ Las cepas fueron aisladas de lesiones cutáneas de 39 pitiriasis versicolor (PV), 23 dermatitis seborreica (DS), 7 dermatitis atópica (DA) y 3 foliculitis (FC).

Previo al estudio de sensibilidad las cepas fueron repicadas en Agar Dixon modificado e incubadas a 32°C durante 3 días.¹⁹ Se introdujeron variantes en la técnica de microdilución en caldo, documento M27-A3 de la CLSI. El medio base fue RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato de sodio, bufferado a pH 7.0 con MOPS 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid y suplementado con glucosa, peptona, extracto de ácidos biliares, extracto de malta, glicerol, Tween y cloranfenicol. El inóculo fue preparado en solución 0.1% Tween 20 (0.5 McFarland).

Se estudió fluconazol (FCZ), ketoconazol (KTZ), miconazol (MCZ), voriconazol (VCZ) y anfotericina B (AMB). Los rangos fueron (µg/ml): 8-0.015 KTZ y VCZ; 16- 0.03 AMB y MCZ y 32-0.06 para FCZ.

Se usaron microplacas de cultivo de 96 pocillos, incluyendo controles de crecimiento y esterilidad en cada placa. Las mismas fueron cultivadas a 32°C y se realizaron lecturas visuales durante 5 días.

Para los azolicos la CIM fue considerada como la menor dilución de la droga a la cual se observa una inhibición del crecimiento $\geq$ al 80% comparado con el pocillo control de crecimiento y para AMB la menor concentración capaz de inhibir completamente el crecimiento de las levaduras. Cepas control de referencia: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258.

RESULTADOS

Las modificaciones realizadas permitieron el desarrollo de las levaduras lipodependientes de *Malassezia spp.*

La CIM para la mayoría de las especies puede ser leída a partir del tercer día de cultivo. La formación de grumos debido a la textura de las colonias

fué frecuente, efecto que puedo solucionarse agitando por pipeteo a fin de disolver los mismos.

El 11% de los aislamientos mostraron el fenómeno de “trailing”. En estas ocasiones, el punto de corte se definió a partir de las 72 horas de incubación.

La Tabla 1 detalla los valores de las CIMs obtenidos para cada especie.

Tabla 1: CIM ($\mu\text{g/ml}$) de los antifúngicos estudiados frente a las distintas especies de *Malassezia*.

	FCZ	n	KTZ	n	MCZ	n	AMB	n	VCZ	n
<i>M. furfur</i> ²⁶	16	1	0,25	2	8	1	4	1	0,125	1
	8	1	0,125	2	4	6	2	4	0,06	7
	4	9	0,03	4	2	6	1	13	0,03	18
	2	9	0,015	18	1	7	0,5	6		
	1	3			0,5	3	0,25	2		
	0,5	2			0,25	1				
	0,25	1			0,125	2				
<i>M. sympodialis</i> ²²	8	1	0,125	1	8	1	4	1	0,06	6
	4	2	0,06	1	4	1	2	3	0,03	16
	2	2	0,03	3	2	1	1	3		
	1	5	0,015	17	1	2	0,5	8		
	0,5	5			0,5	4	0,25	5		
	0,25	4			0,25	4	0,125	2		
	0,125	1			0,125	2				
	0,06	1			0,06	1				
	0,03	1			0,03	6				
<i>M. globosa</i> ¹⁵	4	1	0,03	3	4	1	4	1	0,125	1
	2	2	0,015	12	2	1	1	3	0,06	2
	1	4			1	1	0,5	5	0,03	12
	0,5	5			0,5	3	0,25	4		
	0,25	2			0,25	4	0,125	1		
	0,125	1			0,03	3	0,06	1		
					0,015	2				
<i>M. restricta</i> ⁶	0,25	4	0,06	1	1	1	2	1	0,06	3
	0,125	1	0,03	4	0,5	3	0,5	3	0,03	3
	0,06	1	0,015	1	0,125	2	0,25	1		
							0,125	1		
<i>M. slooffiae</i> ³	4	1	1	1	0,5	2	1	2	0,06	3
	2	1	0,5	1	0,25	1	0,5	1		
	1	1								

DISCUSIÓN

La técnica estandarizada por la CLSI no es aplicable al género *Malassezia*. Diversos autores modificaron este método a fin de estudiar la sensibilidad este género, pero aún no se ha desarrollado una técnica estandarizada que permita resultados comparables y reproducibles.¹⁴⁻¹⁶ En este estudio, con las modificaciones de los suplementos del medio de cultivo y el inóculo propuestos y el tiempo de incubación, se obtuvo un buen crecimiento estas levaduras.

En este estudio, la CIM para la mayoría de las especies pudo ser leída a partir del 3º día de cultivo. Esto concuerda con los datos obtenidos por otros autores.^{16,20}

KTZ y VCZ resultaron ser las drogas con mayor poder de inhibición frente a la mayoría de las especies de *Malassezia*. El 65% de las cepas estudiadas frente a KTZ y el 80% frente a VCZ, mostraron valores de CIM ≤ 0.03 µg/ml. Estos datos que concuerdan con informes de otros autores.^{13,15, 17}

FCZ, en cambio, mostró mayor variabilidad y amplitud en los rangos, expresando diferencias según la especie. *M. furfur* y *M. sympodialis* presentaron los valores más altos, aunque los rangos de mayor frecuencia fueron distintos: para el 69% de las *M. furfur* los valores estuvieron entre 4 y 2 µg/ml, en cambio para el 65% de las *M. sympodialis* entre 1 y 0.25 µg/ml. *M. globosa* también mostró un rango amplio (4-0.125 µg/ml). Esta variabilidad resulta importante considerando que el FCZ constituye una de las opciones terapéuticas más comunes para tratar dermatopatías relacionadas con *Malassezia*.

De acuerdo al documento M27-A3 todos aquellos aislamientos de *Candida* con valores de CIM > 1 µg/ml deben considerarse como resistentes a la AMB. Es importante destacar que en este estudio el 19% de *M. furfur* y el 18% de *M. sympodialis* presentaron CIMs > 1 µg/ml. Esto es importante debido que las especies de *Malassezia* son agentes de potenciales de infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos y AMB es una de las pocas alternativas utilizadas en el tratamiento sistémico.

M. furfur fue la especie que presentó los rangos de CIM más amplios e inclusive las CIM más altas, seguida por *M. sympodialis* y *M. globosa*.

M. restricta y *M. slooffiae* presentaron en general valores de CIMs bajos para todas las drogas testeadas, aunque el número de cepas es escaso como para establecer una conclusión de valor al respecto.

La sensibilidad de las distintas especies de *Malassezia* varía frente a un mismo antifúngico, además se observan diferencias en la sensibilidad de cepas de una misma especie. Es importante por lo tanto desarrollar pruebas estandarizadas para estudiar el género *Malassezia*, a fin de establecer el perfil de sensibilidad de cada una de sus especies y con ello tener una información fehaciente que permita la instauración de un tratamiento adecuado.

RESUMEN

Los organismos del género *Malassezia* han sido reconocidos como miembros de la biota cutánea normal del hombre y los animales. La mayoría de estas levaduras son lípido-dependientes, debido a un defecto en la capacidad de sintetizar ácidos grasos saturados. Los estrictos requerimientos nutricionales del género complican su estudio de sensibilidad. Diversas técnicas han sido ensayadas, pero estos resultados no están referidos a una técnica de referencia haciendo difícil establecer una conclusión de valor sobre la actividad *in vitro* de estas drogas. El objetivo del trabajo fue introducir modificaciones a la técnica de referencia del CLSI para el estudio de sensibilidad antifúngica del género *Malassezia*. Se estudiaron 72 cepas aisladas de muestras clínicas previamente tipificadas por PCR-RFLP. Para permitir el desarrollo de estas levaduras se introdujeron variantes a la técnica de referencia (documento M27-A3) de la CLSI. La determinación de la CIM para la mayoría de las especies pudo ser leída a partir del 3º día de incubación. La suplementación del medio de cultivo, y variaciones del inóculo y tiempo de incubación permitieron buen crecimiento de estas levaduras. KTZ y VCZ resultaron ser las drogas con mayor poder de inhibición frente a la mayoría de las especies. FCZ mostró gran variabilidad y amplitud en los rangos, revelando diferencia entre especies. *M. furfur* fue la especie con valores y rangos de CIM más altos, seguida por *M. sympodialis* y *M. globosa*. Se observaron altos valores para AMB frente a todas las especies. La sensibilidad de las distintas especies de *Malassezia* varía frente a un mismo antifúngico y además se observan diferencias intra-especie. Es importante desarrollar pruebas estandarizadas para evaluar estas levaduras, así establecer el perfil de sensibilidad de cada especie y contar con información útil para un tratamiento adecuado.

ABSTRACT

Malassezia yeasts have been recognized as biota normal skin members in humans and animals. Most of these yeasts are lipid-dependent due to a defect in the ability to produce fatty acids. The strict nutritional requirements of *Malassezia* species make it difficult to test the antifungal susceptibility profile. Several methods have been tried, but these results are not related to a reference method and make difficult to assess antifungal in vitro activities. The objective was to introduce variations to CLSI reference method to study *Malassezia spp.* antifungal susceptibility. 72 isolates were studied, previously identified by PCR-RFLP. To allow development of these yeasts, variants in CLSI document (M27-A3) were introduced. Supplementation of the culture medium and modification on inoculate suspensions and incubation time allowed good growth of these yeasts. KTZ and VCZ proved great inhibitory power against most of the species tested. FCZ showed high values and widest ranges, revealing differences between species. *M. furfur* was the species with highest values and ranges MIC, followed by *M. globosa* and *M. sympodialis*. High values for AMB against all species were observed. The differences observed in the antifungals activity and interspecies variability, demonstrated the importance to studying the susceptibility profile of each species in order to obtain reliable information for defining an effective treatment regimen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Giusiano, G. *Malassezia*. Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. Rev Argent Microbiol 2006; 38: 41-8.
2. Guého E, Boekhout T, Ashbee HR, Guillot J, Van Belckum A, Faergemann J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogen. Med Mycol 1998; 36: 220-9.
3. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson T. Skin diseases associated with *Malassezia* species. J Am Acad Dermatol 2004; 51: 785-98
4. Gupta A, Kohli Y. Prevalence of *Malassezia* species on various body sites in clinically healthy subjects representing different age groups. Med Mycol 2004; 42: 35-42.
5. Ashbee HR. Update on genus *Malassezia*. Med Mycol 2007; 45: 287-303.
6. Guého E, Midgley G & Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek. 1996; 69: 337-55.
7. Sugita T, Tajima M, Takashima M, et al. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. Microbiol Immunol 2004; 48: 576-583.

8. Sugita T, Takashima M, Kodama M, et al. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4695-4699.
9. Hirai A, Kano R, Makimura K, Robson Duarte E, Soares Hamdan J, Lachance M, et al. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J System Evol Microbiol* 2004; 54: 623-7.
10. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, et al. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1363-7.
11. Nell A, James SA, Bond CJ, Hunt B, Herrtage ME. Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. *Vet Rec* 2002; 150: 395-8.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. M27- A3. Volume 28, Number 14. 2008.
13. Gupta A.K., Kholi Y., Faergemann A.Li J., and Summerbell R.C. In vitro susceptibility of seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *British Journal of Dermatology* 2000; 142:758-765.
14. Garau M, Pereiro M Jr, Del Palacio A. In vitro susceptibilities of *Malassezia* species to a new triazole, albaconazol (UR982599) and others antifungal compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2342-2344.
15. Velegraki A; Alexopoulos EC; Kritikou S; Gaitanis G. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species of the new triazole posaconazol and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3589–93.
16. Nakamura Y, Rui K, Mural T, Watanabe S, Hasegawa A. Susceptibility testing of *Malassezia* species using the urea broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2185-6.
17. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *In vitro* activities of ketoconazole, econazole, miconazole, and melaleuca alternifolia (Tea tree) oil against *Malassezia* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 467-9.
18. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Yamada T, Sugita T, Yamaguchi H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *J Microbiol Methods*.2005; 61:281-4.
19. Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J Mycol Med* 1996; 6: 103-110.
20. Miranda KC, Rodrigues de Araujo C, Rodrigues Costa C, Passos XS, Lisboa Fernández OF, Rodrigues Silva MR. Antifungal activities of azole agents against the *Malassezia* species. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29 (2007) 281-284.

ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN NIÑOS CON TALLA BAJA IDIOPATICA.

María Gabriela Ropelato

División de Endocrinología - Centro de Investigaciones Endocrinológicas del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez

Objetivos del proyecto

Estudiar la prevalencia de alteraciones moleculares en el gen que codifica para el receptor de la hormona de crecimiento (GHR) en niños con talla baja idiopática y niveles disminuidos de IGF-I y determinar la utilidad del dosaje en suero de la proteína transportadora de GH (GHBP) que es la porción extracelular del GHR hepático para orientar el estudio molecular del gen GHR de estos pacientes.

En el presente proyecto se caracterizó bioquímicamente el sistema de la hormona de crecimiento e IGFs y sus proteínas transportadoras (GHBP e IGFBP-3) en 192 niños sanos (88 varones/104 niñas) y en 81 niños con talla baja idiopática (TBI) con edades comprendidas entre 4.9 a 17.5 años.

Las características auxológicas, clínicas y bioquímicas se publicaron recientemente en Growth Horm IGF Res. 2013 Dec;23(6):229-36. doi: 10.1016/j.gthr.2013.08.003. Epub 2013 Aug 19. (Se adjunta copia de publicación)

Estudio molecular del gen GHR

La distribución del genotipo del exón 3 del receptor de GH *GHRd3* (fl:fl/fl:d3/d3:d3,%) en niños normales (60:34:6) y en pacientes con TBI (64:32:4) fue similar alcanzando el equilibrio de Hardy-Weinberg. Los niños con TBI mostraron niveles reducidos de GHBP y de los factores de GH dependientes (IGF-1, IGFBP-3, y ALS, todos $p < 0.0001$ vs el grupo normal). En el grupo de niños normales los portadores homocigotas del alelo GHRfl presentaron niveles de GHBP significativamente mayores que los portadores de una o dos copias del alelo GHRd3 (media $\pm$ SEM) GHRfl: 3.2 ± 0.2 vs GHRd3: 2.7 ± 0.2 nmol/L, $p = 0.04$).

En el presente proyecto se estudió la secuencia completa del gen *GHR* en 26 niños con TBI, 13 con por lo menos un factor GH-dependiente < 1.5 SDS (Grupo 1, comunicados en el informe anterior) y 13 con niveles normales de todos estos componentes en suero (Grupo 2). Se amplificaron por PCR y secuenció en forma completa las regiones codificantes (9 exones) y las regiones intrónicas adyacentes del gen *GHR* con los pares de primers elegidos previamente (primer informe).

En la tabla 1 se muestran las características clínicas y bioquímicas del grupo estudiado subdividido según su fenotipo bioquímico de marcadores de acción de GH.

Tabla 1.

TABLA 1	Grupo 1	Grupo 2
Sexo F/M	1/12	3/10
SDSTalla	-2.87±0.36	-2.86±0.57
SDSIMC	-0.66±0.78	-0.34±1.22
SDSGHBP	-1.38±1.20	-0.01±0.86
SDSIGF-I	-2.54±1.46	-0.67±0.90
SDSIGFBP3	-1.48±1.15	-0.66±1.10
SDSALS	-1.89±1.23	-0.99±0.97

Polimorfismos comunes en el gen *GHR*

En los 26 niños con TBI estudiados, se identificaron 7 polimorfismos que se encuentran con elevada frecuencia en la población general (dbSNP-NCBI database, 1000 Genomes Project). La frecuencia de los mismos en los niños con TBI estudiados fue similar a la reportada en la población general según esta base de datos (MAF: Minor Allele Frequency).

En la tabla 2 se muestran los polimorfismos detectados, los cambios en el cDNA y en la proteína, su frecuencia en la población de estudio y la frecuencia según la base de datos MAF en la población general tanto para los niños con fenotipo bioquímico normal o con algún parámetro GH-dependiente disminuido.

Tabla 2.

SNPs /Polymorphisms	Cambio en el cDNA	Cambio en la proteína	Ex/In	MAF*	Grupo 1	Grupo 2
rs 12521020	c.-11-123C>T		In 1	0.326	0.357	0.222
rs 10941579	c.70+120A>T		In 2	0.334	0.357	0.222
rs 6179	c.588A>G	p.G186G	Ex 6	0.336	0.321	0.277
rs 33972388	c.785-58delG		In 7	Not available	0.727	0.667
rs 2973015	c.876-162A>G		In 8	0.451	0.420	0.278
rs 6180	c.1630A>C	p.I544L	Ex 10	0.450	0.428	0.500
d3	Ex 3 deletion		Ex 3		0.250	0.277

Polimorfismos de baja frecuencia en el gen GHR

En 2/13 (15%) pacientes del grupo 1, ambos del sexo masculino, se identificaron en heterocigosis 2 variantes alélicas del gen *GHR* de muy baja frecuencia en la población normal en los exones 7, 10, previamente descriptas y expresadas in vitro (Goddard et al, *N Engl J Med* 1995 y Iida et al. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999). Estas variantes fueron estudiadas también en 50 alelos de niños normales de este proyecto para descartar que se trataran de polimorfismos comunes en el gen *GHR*. Cabe destacar que estas variantes alélicas del gen *GHR* fueron identificadas en dos pacientes que presentaron GHBP (porción soluble del dominio extracelular del receptor de GH) en el rango inferior de lo normal.

En un niño con TBI del grupo 2 se detectó una variante en heterocigosis de muy baja frecuencia (rs34853905; Minor Allele Frequency according to dbSNP-NCBI database: 0.0009). En este paciente, el cambio de una citosina por una timina en el exón 10 (región codificante del dominio intracelular del gen *GHR*) predice el cambio de una Arginina por una Cisteína (p.R386C). Esta variante genética no se encontró en 42 alelos normales de la población local. El aminoácido afectado está conservado en las distintas especies. Los programas de evaluación in silico predicen que el cambio es deletéreo (Mutation 2.0, Polyphen II y Mutation Taster).

La tabla 3 muestra las características auxológicas y bioquímicas de los pacientes que, en el presente trabajo de investigación, presentaron variantes del gen *GHR* de baja frecuencia.

Tabla 3.

Exón/Intrón Variante del gen GHR (rs)	Exón 7 p.R229H rs6177	Exón 10 p.C440F rs6182	Exón 10 p.R386C rs34853905
MAF (DB SNPs-NCBI)	0.007	0.037	0.0009
SDS Talla	-2.19	-2.62	-3.2
GH máxima	18.0	29.4	9.2
SDS IGF-I	-0.76	-1.39	-0.41
SDS IGFBP-3	-1,36	-0.79	
SDS ALS	-0.66	-0.91	0.21
SDS GHBP	-1.98	-1.81	-0.13
Frecuencia alélica en:			
Normales	0/50	0/50	0/42
TBI	1/26 (3,8%)	1/26 (3,8%)	1/26 (3,8%)

CONCLUSIONES

El empleo de la genética molecular del gen GHR en el presente estudio ha permitido al identificación de 2 portadores heterocigotas de variantes de baja frecuencia en los exones 7 y 10 (previamente reportadas en la literatura) en un subgrupo de niños con TBI y marcadores bioquímicos de acción de GH disminuidos. Interesantemente, también se identificó un paciente con TBI y marcadores bioquímicos de acción de GH normales, que habitualmente no se asocia a insensibilidad a la GH, que presenta una variante génica de muy baja frecuencia. Ninguna de estas variantes fue detectada en un grupo de niños normales. Debido a que la variante p.R386C fue detectada en el exón 10 que codifica para la porción intracelular del GHR, un nivel de GHBP normal permitiría orientar el estudio de este exón y regiones intrónicas adyacentes que codifican para este dominio en pacientes TBI con sospecha de insensibilidad a la acción de GH y fenotipo bioquímico de marcadores de acción de GH normales.

En nuestro estudio, la prevalencia de variantes genéticas de baja frecuencia en el gen GHR en niños con TBI fue del 11.5%, superior a lo reportado en otras series clínicas.

Nuestros resultados sugieren que en sujetos con talla baja aparentemente idiopática caracterizar los niveles séricos de los factores de crecimen-

to GH-dependientes y sus proteínas transportadoras permite comprender la fisiopatología de la baja talla, sin embargo el hecho de que estos factores se encuentren dentro de valores normales no descartan alteraciones moleculares en el gen *GHR*.

ECOEPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA Y VISCERAL EN UNA COMUNIDAD DE POBLADORES ORIGINARIOS DE EL IMPENETRABLE, TRES ISLETAS, CHACO, EN COORDINACIÓN CON EL SISTEMA DE SALUD LOCAL.

Juan Rosa, Parras Matías, Szelag Alejandro, Salomón OD¹.
Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste. ¹Instituto
Nacional de Medicina Tropical. Puerto Iguazú, Misiones.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica parasitaria causadas por un protozoo del género *Leishmania* (Trypanosomatidae) intracelular obligado en células del sistema retículo endotelial (principalmente macrófagos) y es transmitida por la picadura de la hembra de un díptero hematófago (Phlebotominae).

Esta enfermedad en sus formas clínicas Tegumentaria (LT), que afecta piel y mucosas y la Visceral (LV) que compromete a órganos del sistema retículoendotelial, está ampliamente distribuidas en países de climas tropicales y subtropicales, generando verdaderos problemas sanitarios destacándola entre las enfermedades emergente re-emergente¹.

En América se extienden desde los 19°N (Méjico) hasta los 29°S en Argentina donde la LT es endémica en nueve provincias comprendidas en las regiones del NOA, NEA y Chaco con 40 a 90 casos/año hasta los 80's. Desde entonces se presentaron brotes epidémicos hasta de 1400 casos/año cada vez más frecuentes y dispersos, y desde el año 2000 nuevos registros de vectores potenciales se notificaron en las provincias de Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos. El reservorio de la LT en Argen-

tina no está identificado, sin embargo, en la LV, el perro familiar (*Canis familiaris*) demostró ser un importante reservorio involucrado durante los ciclos de transmisión, similar a los ciclos endémicos/epidémico urbanos en América.²

El primer caso autóctono de LV fue en el 2006 en la provincia de Misiones producido por *Leishmania infantum* (Syn *chagasi*). Actualmente existe transmisión en Corrientes, Santiago del Estero, Formosa y Salta con 102 casos humanos acumulados, doce fallecidos (Servicio Nacional de Vigilancia de la Salud, Ministerio de Salud de la Nación) miles de casos caninos, y el

vector *Lutzomyia longipalpis*, dispersándose hacia el sur³. De las 23 especies patógenas de *Leishmania* descriptas mundialmente, en Argentina circulan cuatro: *Le. (Viannia) braziliensis*, *Le. (Leishmania) amazonensis*, *Le. (V.) guyanensis* que son los agentes etiológicos de las formas tegumentarias^{4,5,6} y *Le. infantum* (Syn. *chagasi*), de la forma visceral⁷.

De las 700 especies de flebotominos reconocidas en la naturaleza, al menos 70 están incriminadas como vectores potenciales de alguna *Leishmania*. En la Argentina actualmente se citan 29 especies, de las cuales, tres se hallaron naturalmente infectadas con *Le. braziliensis*: *Lutzomyia neivai*, *Lu. cortelezzii* y *Lu. whitmani* en las provincias de Tucumán, Chaco y Misiones, respectivamente y *Lu. longipalpis* infectada con *Le. infantum* en Misiones (8,9). En todos los casos, son necesarios estudios de competencia vectorial para confirmar su rol en el ciclo de transmisión. Otras especies de flebotomos se consideran probables vectores por asociación o por abundancia en áreas de transmisión activa como *Lu. migonei*, vector putativo de LV en la región chaqueña¹⁰. Actualmente en la provincia del Chaco, el mapa de distribución está conformado por ocho especies de Phlebotominae potenciales vectores de LT¹¹.

La notificación de casos humanos de Leishmaniasis Tegumentaria (LT) a los sistemas de salud nacionales y provinciales se basan en la consulta voluntaria, interpretándose que cada uno representaría la “punta del iceberg” desde el punto de vista epidemiológico. En la provincia del Chaco en particular, sin consignar fecha de estudio, se refirió un brote epidémico de LT en la localidad Cancha Larga, Departamento Libertador General San Martín, destacando las actividades de los pobladores (hacheros) en contacto con parches de vegetación, pero sin mencionar la situación de riesgo endémico¹². En 1996 se registró un brote de LT en General Vedia, Departamento Bermejo en pobladores del área urbana capturándose *Lu. neivai* en estudios asociados al brote, destacándose el riesgo de dispersión y nuevos brotes¹³.

En el 2010 se demostró la presencia de *Lu. longipalpis*, vector de la LV, a partir de trabajo sobre vigilancia de la LV en Chaco en coordinación entre Ministerio de Salud Pública de Nación a través del Centro de Diagnóstico e Investigación en Endemoepidemias (CeNDIE), Programa Nacional de Leishmaniasis (PNL) y Ministerio de Salud Provincial.¹⁴

Al presente, no se registran antecedentes de estudios relacionados con la búsqueda activa de casos humanos de LT ni de LV. Por ello, teniendo en cuenta la alta morbilidad de la leishmaniasis, la letalidad de la LV que alcanza en humanos al 8-10% y sin tratamiento al 90%, a la rápida dispersión que ha

tenido hacia el sur el complejo vector-perro infectado, a la aparición de perros importados con LV en la provincia del Chaco (Resistencia y Machagay) y a la transmisión típicamente urbana que adquirió en el Cono Sur, se iniciaron estudios ecoepidemiológicos de la LT y la vigilancia de la LV orientados a la prevención y al control vectorial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y sitio de muestreo

La búsqueda activa de casos humanos con leishmaniasis tegumentaria y/o visceral y la captura de flebótomos se iniciaron en el mes de diciembre de 2010 en el municipio Tres Isletas, (26°20'24"S, 60°25'54"O) ubicado en la región centro norte provincial, en la franja transicional de las Sub Regiones Distrito Chaco Oriental (húmedo) y el Distrito Chaco Occidental (seco).

Búsqueda activa de casos humanos de Leishmaniasis Tegumentaria (LT) y Leishmaniasis Visceral (LV)

La búsqueda activa de casos clínicos humanos compatibles con leishmaniasis se realizó en coordinación con el sistema de salud local. Los puestos sanitarios de cada paraje conformaron las unidades de muestreo y las familias correspondieron a las unidades de observación. De esta forma se aplicó el muestreo probabilístico por conglomerados debido a la distante distribución espacial de las unidades de observación y se determinó el número de la muestra para realizar un muestreo sistemático.¹⁵ Las visitas domiciliarias se realizaron en compañía de un agente sanitario quien ofició de intérprete ante pobladores originarios de la etnia Quom. Se desarrolló un interrogatorio individual a las personas mayores de 15 años y a los tutores de niños y jóvenes de hasta 14 años de edad. Para la identificación de posibles casos de LT (cutánea y/o mucocutánea) se aplicaron los criterios de inclusión a toda persona con cicatrices compatibles con LT y/o úlceras dérmicas activas de más de 30 días de evolución y sin respuesta al tratamiento médico convencional. En el caso mucocutáneo, a aquellas con antecedentes de epistaxis y signos de flogosis y/o perforaciones del tabique nasal independientemente del tiempo de evolución y tratamientos convencionales previos. Para la búsqueda de casos de LV, se incluyeron a aquellos con síndrome febril prolongado de origen desconocido de más de 30 días de evolución con o sin esplenomegalia y/o adenopatías.

Captura de Phlebotominae

Se seleccionó una vivienda habitada en el área rural, Paraje Lalelay (26°20'22"S; 60°15'44") por evidenciar características de peor escenario por presentar mayor probabilidad de desarrollo del ciclo biológico del flebótom (gallineros, corrales, sombra vegetal, acumulación de basura orgánica entre otras). El ecotono se destacó por formaciones vegetales de bosque de quebracho/palo santo (*Schinopsis*, *Aspidosperma* / *Bulnesia*) y cardonales con evidente deforestación y antropización del bosque. Se utilizaron trampas luminosa tipo CDC¹⁶ con permanencia de 12hs (19:00 a 07:00hs) con frecuencia mensual de una noche. Se instaló una trampa a 1,5m de altura del nivel del suelo en el domicilio (interior de la vivienda), en peridomicilio (corrales de ganado caprino y porcino) hasta 10m de la vivienda y en bosque, una trampa distante a 110m de la vivienda. Asimismo, en el bosque se instalaron dos trampas en un árbol para realizar capturas en paralelo en base y en altura, a 1,5m y 10m del suelo, respectivamente. Los ejemplares vivos se separaron en recipientes adaptados para su transporte al laboratorio para estudios de infección natural con *Leishmania* e identificación taxonómica.¹⁷

RESULTADOS Y COMENTARIOS

Búsqueda activa de casos humanos de Leishmaniasis Tegumentaria (LT) y Leishmaniasis Visceral (LV)

De los 15 puestos sanitarios existentes en el área rural de la localidad de Tres Isletas, se realizaron las encuestas domiciliarias en los parajes Lalelay, Cabá-ñaró y El Tacuruzal, distantes a 33, 30 y 41km del ejido urbano. En total se registraron 220 familias y se visitaron 44, observándose a 215 individuos cuya distribución quinquenal se detalla en la Tabla 1 no habiéndose registrado casos humanos compatibles.

Fauna Phlebotominae

Desde diciembre de 2010 a diciembre de 2012 se capturaron seis especies de flebotominos: *Lutzomyia migonei* (82%), *L. cortezezzii* (2,4%), *L. sallesi* (5%), complejo *Cortezezzii*: incluye a hembras de *L. cortezezzii* y *L. sallesi* de morfología similar (9%), *L. neivai* (0,3%), *L. shannoni* (0,1%) y *Brumptomyia brumpti* (1,2%). En la distribución mensual detallada en la Tabla 2, se destaca que *Lutzomyia migonei* fue la especie más abundante, destacándose en diciembre de 2011 (n=309) con promedios puntuales de temperatura y

humedad relativa 31°C (39,3 y 22,6) y 32% (53 y 10), respectivamente. En los meses de febrero y junio de 2011 y abril, junio y septiembre de 2012 no se capturaron flebotomos, coincidiendo con registros de temperatura y humedad relativa promedios de 9,2°C (20,8 y -2,4) y 61% (99 y 23) para este mes y sin datos en el mes de febrero por inconvenientes técnicos. La correlación de la distribución de las especies de flebotominos con los ecotopos domicilio, peridomicilio y extradomicilio (altura y base), destacan a *L. migonei* y *L. complejo cortezezzii* como las más abundantes. El peridomicilio fue el ecotopo con mayor abundancia de flebotominos con predominio de *L. migonei* (n=301), en tanto que en base y extradomicilio lo fue mayoritariamente a *L. complejo cortezezzii* (n=38) y al resto de las especies (n=154). En cuanto a la variación estacional, se colectaron flebotominos en todas las estaciones anuales, destacándose la mayor abundancia en verano y otoño del primer año de captura, mientras que el menor registro fue en el invierno del mismo período. Durante el segundo año de muestreo, los registros demostraron mayor abundancia en primavera e invierno, respectivamente seguidos del otoño y verano. Los promedios de registros de temperatura ambiente y humedad relativa marcaron los valores más elevados en otoño 20°C; 22°C y 74%;76%, respectivamente en ambos períodos de estudio (Figura 1). En el invierno, los mayores registros se dieron en la base con presencia de *L. migonei* y *L. complejo cortezezzii*. En primavera la mayor captura se registró en base y en extradomicilio, respectivamente con presencia de *L. complejo cortezezzii* y en altura predominó *L. migonei*. En el domicilio y peridomicilio, corral caprino (chivo) se capturaron el resto de las especies en menor abundancia.

Infección natural

En total se disecaron 60 hembras de flebotominos y se confeccionaron seis lotes de diez ejemplares cada uno según especies y estrato: *L. migonei*: 5 lotes (caprino: 3 y base: 2) y complejo *Cortezezzii* (incluye hembras de *L. cortezezzii-sallesii*: 1 lote (altura). Las hembras fueron disecadas individualmente bajo lupa estereoscópica y observadas a 40X en microscopía óptica donde no se observaron flagelados intestinales. El material fue remitido al centro de referencia nacional (Universidad Nacional de Misiones. Laboratorio de Biología Molecular Aplicada. Facultad de Ciencias Exactas, Química y Naturales) para su determinación mediante la metodología molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR.

Los resultados, por una parte, de la búsqueda activa destacan que no se hallaron casos humanos de leishmaniasis tegumentaria y visceral en los

parajes rurales estudiados, pero por otra parte se registraron flebótomos potenciales vectores de esta parasitosis. En la distribución y abundancia de especies en el estrato de altura, predominan en abundancia *L. migonei* y las del complejo *L. cortelezzii* en todas las estaciones del año excepto en invierno cuando se las hallaron en base. Este comportamiento podría deberse en el caso de las hembras, por la búsqueda de algún animal como fuente de alimentación, y la presencia de los machos por atracción hormonal a las hembras, demostrados para *L. longipalpis*¹⁸. Asimismo, la presencia de flebótomos en el estrato vertical, se justificarían por la influencia de los factores abióticos del ecotono como diferencia de temperatura entre base y altura, humedad relativa, intensidad de la luz, entre otros¹⁹.

La presencia de flebotominos, potenciales vectores de leishmaniasis en la región de estudio en estratos horizontal y vertical, asociados a ambientes antrópicos, sustentan la base como herramienta para estudios epidemiológicos que involucren a la determinación de la fuente de alimentación sanguínea del insecto transmisor y a identificar a los animales como probables reservorios en el ciclo de transmisión de la enfermedad.

Tabla 1: Total de la población rural según edad y sexo en los parajes Lalelay, Cabañaró y El Tacuruzal. Tres Isletas, Chaco.

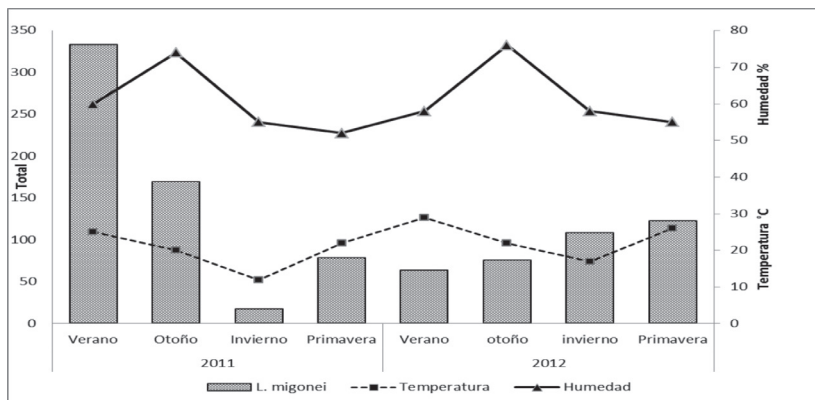
Edad	Sexo		Total
	M	F	
0 - 4	10	18	28
5 - 9	19	10	29
10 - 14	4	17	21
15 - 19	9	12	21
20 - 24	11	6	17
25 - 29	9	7	16
30 - 34	3	9	12
35 - 39	6	2	8
40 - 44	4	4	8
45 - 49	6	3	9
50 - 54	5	5	10
55 - 59	9	5	14
60 - 64	4	2	6
65 - 69	4	3	7
70 y más	4	5	9
Total	107	108	215

Tabla 2: Distribución mensual de flebótomos capturados con trampa de luz tipo CDC. Tres Isletas, Chaco. Diciembre 2010 – diciembre 2012.

Año	2010	2011												2012												
Mes	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Total
<i>L. migonei</i>	1	24	0	99	69	1	0	4	13	17	23	38	309	16	13	16	0	59	25	0	83	0	90	32	34	966
<i>L. complejo cortezezzii</i>	2	12	0	3	13	0	0	0	2	4	1	10	27	1	0	2	0	0	0	0	8	0	12	9	1	107
<i>L. sallesi</i>	0	4	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	24	1	2	2	0	1	0	0	0	0	9	9	0	56
<i>L. cortezezzii</i>	0	0	0	1	4	0	0	0	0	2	0	0	12	1	5	0	0	1	0	0	0	0	0	5	0	31
<i>L. neivai</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>L. shannoni</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>B. brumpti</i>	0	3	0	3	5	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14
TOTAL	3	44	0	107	93	1	0	5	15	24	24	48	378	19	20	20	0	61	25	0	91	0	111	55	35	1179

L: *Lutzomyia*, B: *Brumptomyia*, *incluyen hembras de morfología similar de *Lutzomyia sallesi* y *L. cortezezzii*, †sólo machos, ‡sólo machos

Figura 1: Distribución estacional de flebótomos capturados según promedios de variables climáticas.



RESUMEN

La notificación de casos humanos de leishmaniasis tegumentaria y visceral en Argentina se basa en la consulta voluntaria del paciente generando subregistros en el sistema de salud a pesar de ser una enfermedad de denuncia obligatoria. Por esta razón se aplicó la búsqueda activa de casos humanos en el área rural de Tres Isletas, Chaco, perteneciente al área de transición fitogeográfica de chaco seco y húmedo. En base a fuentes secundarias de base de datos de casos humanos registrados en el hospital regional, durante dos años consecutivos se realizó paralelamente la captura de flebótomos en una vivienda habitada del área rural. No se observaron casos compatibles con leishmaniasis tegumentaria o visceral en los parajes seleccionados por estratos. Se registraron flebótomos capturados con trampas de luz de 12hs de permanencia mensual en los estratos horizontales y verticales: *Lutzomyia migonei*, *L. complejo cortelezzii* (incluyen hembras de *L. cortelezzii* y *L. sallesi* de morfología similar), *L. cortelezzii* (sólo machos), *L. sallesi* (sólo machos), *L. neivai*, *L. shannoni* y *Brumptomyia brumpti*. Se destacó la abundancia de *L. migonei* en todas las estaciones de los dos años de estudio. Este carece de importancia epidemiológica por no transmitir leishmaniasis. Las dos primeras fueron implicadas en el ciclo de transmisión por abundancia y antecedentes epidemiológicos.

ABSTRACT

The reporting of human cases of cutaneous and visceral leishmaniasis in Argentina is based on the patient's voluntary consultation generating sub-fields in the health system despite being a registered illness. For this reason we applied the active search for human cases in the rural area of Tres Isletas, Chaco, belonging to the transition area of Chacoan phytogeographic dry and wet regions. Based on secondary sources database of human cases in the regional hospital for two consecutive years was conducted in parallel to capture an inhabited dwelling sandflies in rural areas. There were no cases support or visceral leishmaniasis in the selected sites by strata. Sandflies were captured with light traps monthly residence 12pm in horizontal and vertical strata: *Lutzomyia migonei*, *L. cortelezzii* complex (including females and *L. cortelezzii sallesi* similar morphology), *L. cortelezzii* (males), *L. sallesi* (males), *L. neivai*, *L. shannoni* and *Brumptomyia brumpti*. It emphasized

the abundance of *L. migonei* in all seasons of the two years of study. This epidemiological unimportant not transmits leishmaniasis. The first two were involved in the transmission cycle of abundance and epidemiological history.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. WHO ed. 2010; 949.
2. Salomón O. Leishmaniasis. En: Cacchione R, Durlach R, Larghi O (eds). Temas de zoonosis II. Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis; 2004.p. 281-89.
3. Salomón O, Fernández M, Santini M, Saavedra S, Montiel N, Ramos M, Rosa J, Szelag E, Martínez M. Distribución de *Lutzomyia longipalpis*, en la mesopotamia argentina. Medicina (Buenos Aires) 2011;71: 22-26.
4. Segura E, Piquin A, Cuba Cuba C, Abramo Orrego L, McMahon Pratt D, Montamat E, Momen H, Grimaldi Jr G Molecular and biologic characterization of *Leishmania* parasites implicated in an epidemic outbreak in northwestern Argentina. Parasitol Res 2000; 86:504-08.
5. Frank F, Fernández M, Caffaro C, Cajal P, Zoclo V, Taranto N, Malchiodi E. Caracterización de la infección por *Leishmania* ssp. en el Chaco Salteño: respuesta humoral, infección doble con *T. cruzi* y especies de *Leishmania* involucradas. Medicina (Buenos Aires) 2000; (Supl.III):86-87
6. Marco J, Barroso P, Calvopina M, Kumazawa H, Furuya M, Korenaga M, Cajal S, Rea M, Borda C, Basombrio M, Taranto M, Hashiguchi Y. Species assignation of *Leishmania* from human and canine american tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in North Argentina. Am J Trop Med Hyg 2005; 72: 606-11.
7. Salomon O, Sinagra A, Nevot M, Barberian G, Paulin P, Estevez J, Riarte A, Estevez J. First Visceral Leishmaniasis Focus in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008;103¹:109-11.
8. Córdoba Lanús E, Lizarralde De Grosso M, Piñero J, Valladares B, Salomón O. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. Acta Trop 2006; 98¹:1-5.
9. Fernández M, Salomón O, Cavia R, Perez A, Acardi S, Guccione J. *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. Acta Trop 2010; (114):81-7.
10. Salomón O, Rosa J, Stein M, Quintana M, Visintín A, Spinelli R, Rossi G, Bogado de Pascual M, Molinari M, Morán L, Valdez D, Bezzi G, Romero Bruno M, Quiriconi R. Phlebotominae fauna in the Chaco region and Cutaneous Leishmaniasis transmission patterns, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008^a;103(6):578-84.
11. Rosa J, Salomón O, Andrade Filho J, Carvalho G, Szelag E, Stein M, Tapia E, Brazil R. Distribution of Sandflies (Diptera: Psychodidae) in the province of Chaco, Argentina. Neotrop Entomol 2010; 39(2):303-05.

12. Miranda O, Balbachán S, Merino D, Galván M, Moro S, Zibelman O, Salazar J, Merino S. Brote de leishmaniosis en Cancha Larga, Chaco, Argentina. *Rev Cubana de Med Trop* 1999; 51(2):69-71.
13. Salomón O, Bogado de Pascual M, Molinari L, Verri V. Study of cutaneous leishmaniosis outbreak in General Vedia, Province of Chaco, 1996. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2001; 43:99-104.
14. Salomón O, Rosa J, Fabiani M, San Miguel S, Szelag E, Nepote M, Parras M. Distribución de *Lutzomyia longipalpis* en las provincias de Formosa, Chaco y Santa Fe (Reconquista), Argentina, 2010. *Medicina* (Buenos Aires). En prensa 2011.
15. Canales FH, de Alvarado EL, Pineda EB. Metodología de la Investigación. Manual para el Desarrollo de Personal de Salud. Org Panam de la Salud, 3ª Ed. Año.1986pp327. Ed. Limusa S.A. Mexico.
16. Sudia W, Chamberlain R. Battery operated light traps an improved model. *Mosq News* 1962;22:126-29. En: Azevedo A, Souza N, Memeses C, Costa W, Costa S, Lima J, Rangel E. Ecology of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the North or the State of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(4):459-64
17. Young D, Duncan M. Guide to the Identification and Geographic Distribution of Lutzomyia Sand Flies in the Mexico, the West Indies, Central and the South America (Diptera:Psychodidae). *Mem Am Entomol Inst* 54, Associated Publishers; 1994.
18. Salomón OD, Araki AS, Hamilton JGC, Acardi SA, Peixoto AA. 2010. Sex pheromone and *period* gene characterization of *Lutzomyia longipalpis sensu lato* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) from Posadas, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105(7): 928-930.
19. Chaniotis BN, Correa MA, Tesh RB, Johnson KM. 1971. Daily and seasonal man-biting activity of Phlebotominae sandflies in Panamá. *J. Med. Ent.*, 8(4): 415-420.

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR DE LA HIDATIDOSIS EN MISIONES, ARGENTINA

Katherina Vizcaychipi, Natalia Macchiaroli, Marcela Alejandra Cucher,
Laura Prada, Mara Martínez, Laura Kamenetzky, Federico Camicia,
Gustavo Carballo, Antonio D'Alessandro, Mara Cecilia Rosenzvit.
Instituto de Microbiología y Parasitología Médica IMPaM-UBA-CONICET.

INTRODUCCIÓN

América del Sur es una de las regiones del mundo más afectada por la hidatidosis, una enfermedad parasitaria desatendida (WHO/DFID-AHP, 2006) de importancia en medicina humana y veterinaria. Esta zoonosis es causada por el estadio larval (metacestode o quiste hidatídico) de pequeños gusanos aplanados del género *Echinococcus* (familia Taeniidae) que infectan a los cánidos y félidos. Las tres formas clínicas de la enfermedad son la hidatidosis quística causada por *E. granulosus*, la hidatidosis alveolar causada por *E. multilocularis* y la hidatidosis poliquística cuyos agentes etiológicos son *E. vogeli* y *E. oligarthrus*. En las últimas décadas se reconocieron alrededor de 200 casos nuevos de hidatidosis poliquística causada por *E. vogeli*, desde Panamá, Colombia y Venezuela hasta Brasil y Perú (D'Alessandro y Rausch, 2008). La supervivencia de *E. vogeli* depende de la relación predador/presa entre *Speotus venaticus* (perro grullero, zorro vinagre) y *Cuniculus paca* (aca), su presa predilecta. Estos dos animales son, hasta ahora, los únicos hospederos naturales conocidos de *E. vogeli*. Ambos se encuentran distribuidos desde Colombia hasta la zona de bosques tropicales de Perú, Bolivia, Paraguay, Brasil y norte de Argentina (Drüwa y col., 1977; Chebez y col., 2000). Los perros domésticos son el puente entre el ciclo silvestre perro grullero–paca y la infección en el hombre, debido a que durante las cacerías los perros son alimentados por vísceras de pacas. (Rausch y col., 1981). Teniendo en cuenta que la provincia de Misiones está cubierta por bosques tropicales, su cercanía geográfica con la región endémica de Brasil y la presencia simultánea de perros grulleros y pacas (Vizcaychipi y col., 2007; Dematteo y col., 2008) proponemos como hipótesis de este trabajo que la infección por *E. vogeli* estaría presente.

Por otro lado, *E. granulosus* está compuesto por un conjunto de cepas o genotipos, habiéndose identificado fehacientemente 9 genotipos del parásito (G1-G8 y G10). La caracterización de las cepas contribuye tanto al conocimiento de la biología del parásito como al control de la hidatidosis quística (Rosenzvit y col., 1999 y Kamenetzky y col., 2002) dado que las mismas difieren en factores tales como la infectividad hacia el hombre y antigenicidad de moléculas utilizadas para el control, como por ejemplo moléculas vacunales (Álvarez Rojas y col., 2013). En Argentina y otros países de América del Sur se ha descripto la presencia de 5 de estos genotipos, cuatro de ellos causantes de infecciones en el hombre.

Las nueve regiones geográficas de Argentina registran casos de hidatidosis quística. La provincia de Misiones, ubicada en la región mesopotámica, carece de datos. Por este motivo, se propuso en este trabajo conocer la situación de la enfermedad hidatídica en dicha provincia, en hospedadores definitivos e intermediarios, incluyendo los ciclos silvestres de transmisión del parásito.

Asimismo, se cuenta con muy pocos datos sobre la situación de la hidatidosis en la región del Noroeste Argentino (NOA), en la cual las cabras, ovejas y camélidos americanos podrían ser reservorios del parásito. Por otro lado, dado que esta zoonosis es endémica en otras áreas de América del Sur, como las regiones montañosas de Perú, se encuentran en marcha proyectos conjuntos entre Argentina y Perú (Santibañez y col., 2008) para realizar estudios epidemiológico-moleculares de la hidatidosis. Por este motivo, se dispone de muestras de alpacas y cabras de cuatro Departamentos del país andino. El análisis molecular de dichas muestras permitirá contar con una primera aproximación sobre las especies y genotipos causantes de hidatidosis en regiones de geografía y actividad pecuaria similar al área de Alta Montaña del NOA.

Los datos obtenidos a partir de este estudio ayudarán al diseño de futuras estrategias de salud pública y ambiental a nivel nacional y regional. El análisis de muestras caprinas y de camélidos americanos permitirá conocer cuáles son las especies/cepas que los infectan y su importancia para el mantenimiento de cepas infectivas para el hombre.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Estudio en humanos

Se trabajó sobre poblaciones de zonas rural y urbana de dos localidades de la provincia de Misiones.

Zona Rural: La población estudiada correspondió a los barrios: Florida situado al Sur de la Ciudad de Eldorado y al Barrio Rural el Timbó, situado al Sur Este de la Ciudad de Apóstoles. Ambos barrios se encuentran atravesados por caminos vecinales de difícil acceso y circulación en días lluviosos. *Los pobladores viven en su mayoría en casas precarias con patios de tierra, sin cercas divisorias, tienen servicio eléctrico pero carecen de sistemas cloacales.* La actividad económica está basada en la agricultura, forestación y ganadería. Siendo la caza de animales silvestres para consumo propio, habitual en los pobladores estudiados.

Zona Urbana: La población estudiada correspondió a pacientes que por diversos motivos concurren a un laboratorio de análisis clínico de la ciudad de Apóstoles y que accedieron a formar parte del estudio.

De ambas zonas se estudiaron al azar un total de 35 personas, cuyas edades oscilaron entre 6 y 84 años, de ambos sexos (Tabla n°1). Las investigaciones llevadas a cabo sobre las personas se ajustaron a lo establecido por la Declaración Universal de los Derechos Humanos de 1948, las normas éticas instituidas por el Código de Núremberg de 1947 y la Declaración de Helsinki de 1964 y sucesivas enmiendas y a lo normado por la Ley Nacional 25.326 de protección de datos de las personas

Tabla 1. Distribución de la población según localidad estudiada. Provincia de Misiones, Argentina.

LOCALIDAD	ZONA	(n)	SEXO Masculino/Femenino
APÓSTOLES	RURAL	6	2/4
	URBANA	4	3/1
ELDORADO	RURAL	25	10/15
Total (N)		35	15/20

Instrumento de recolección de la información

Se utilizó un cuestionario constituido por preguntas de tipo dicotómicas y de respuestas múltiples. Se realizó una visita previa con la finalidad de

informar el objetivo del estudio obteniéndose su consentimiento por escrito y proporcionando los datos que permitieron captar los aspectos: demográficos, socioeconómicos – culturales y clínicos.

Serología

Las muestras de sangre humana fueron obtenidas por punción venosa y fueron trasladadas para ser procesadas en el Departamento de Parasitología INEI ANLIS “Carlos G Malbrán”, donde se realizaron las técnicas de IgG-ELISA in house (valor de cut-off: 0,210; DO < 0,210: negativo; DO entre 0,211 y 0,290: indeterminado; DO $\geq$ 0,290: positivo) y Western-blot in house (WB positivo: visualización de las bandas inmunogénicas de 57 y 67 kDa, características del antígeno 5 de *E. granulosus*). Para ambas técnicas se utilizó como antígeno líquido hidatídico total (LHT) de quistes ovinos según Oriol y col. (1971).

B. ESTUDIO EN ANIMALES

Muestras de Bovinos

Se recibieron 3 quistes de origen bovino, con sospecha de hidatidosis. Las vísceras fueron recogidas el mismo día que se llevó a cabo la faena y colocadas en alcohol 70% para ser remitidas al Departamento de Parasitología, acompañadas de su respectiva ficha de trazabilidad y datos epidemiológicos.

Muestras de roedor: Paca (*Cuniculus paca*)

Se recibieron muestras de vísceras de 4 ejemplares de *Cuniculus paca*, muertos por causa desconocida no traumática, procedentes de la región centro oeste de Misiones, autopsiadas por la Dra. Marcia Hellou del INTA de Cerro Azul. Sólo se encontraron quistes en hígado, de un ejemplar de paca, previamente recolectado en formol al 10%.

Muestras de roedor: Coendú (*Sphiggurus spinosus*)

Se recibió material de bazo, con presencia de quiste, conservado en etanol 70%.

Muestras de camélidos americanos y cabras

Se recibieron muestras de arenilla y paredes quísticas de quistes obtenidos de alpacas de los departamentos de Ayacucho y Puno, Perú y cabras de

los departamentos de Chíncha y Lima, Perú. Estas muestras fueron remitidas por Héctor García y Saúl Santibañez de la Universidad de Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Obtención y evaluación de los quistes hidatídicos:

- Una vez llegadas al laboratorio, las muestras fueron procesadas de la siguiente manera:
- Se separó el quiste de la víscera.
- Se determinó su tamaño y apariencia.
- Todos los quistes fueron punzados, utilizando jeringas hipodérmicas estériles.
- Microscópicamente se los clasificó según las características que presentaba el líquido hidatídico, en: fértiles (con protoescolices) o infértiles (sin protoescolices).
- Una vez abiertos se observó el estado y aspecto de la membrana registrándose el color y las características del quiste.
- Los quistes calcificados y en mal estado no fueron procesados.
- Los quistes de paca y coendú preservados en formol al 10%, fueron seccionados a 4 y 6 μm , coloreados con hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS), Gomory/Mallory/Mason para colágeno y coloración de Von Kossa para concreciones de calcio.
- Del aspirado obtenido de cada quiste se separaron dos fracciones: una para ser utilizada en los análisis de biología molecular y otra para análisis morfométrico.

Estudio microscópico - morfométrico

Se observó el sedimento del líquido aspirado de los quistes al microscopio de luz, en busca de ganchos rostellares y protoescolices. Para el **análisis morfométrico** de los ganchos de la larva, se utilizó microscopio óptico

con objetivo de inmersión (1000 x) y ocular micrométrico calibrado, según método de Rausch y col. (1978). Para el aclaramiento de los protoescólices y mejor visualización de los ganchos se utilizó azul de algodón-lactofenol. En la medición de los ganchos se consideraron: la medida de longitud total de los ganchos grandes (LTG), la de los ganchos pequeños (LTP) y la relación porcentual del tamaño hoja/mango. Todas las medidas incluidas en este trabajo fueron realizadas por un único operador.

ESTUDIOS MOLECULARES

Obtención de ADN

El ADN genómico fue extraído a partir de protoescólices o capa germinal de los quistes hidatídicos mediante el kit MagNA Pure compact Nucleic Acid Isolation I-ROCHE en el caso de quistes bovinos, o DNAeasy Tissue Kit (QIAGEN) para los quistes de cabras y alpacas, siguiendo protocolos de extracción de los fabricantes. La integridad y cantidad del ADN extraído se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para los quistes de paca que fueron conservados en formol al 10%, se intentó la extracción de ADN utilizando los kits mencionados y otros protocolos de extracción de ADN como: fenol/cloroformo, lisis alcalina (Boubaker y col., 2013), y los protocolos descritos por Coura y col. (2005), Naidich y col. (2006); Hüttner y col. (2008) y Velázquez y col. (2011).

Amplificación del fragmento dCO1 específico para *E. granulosus*

Esta reacción se realizó como fue descrito por Cabrera y col. (2002) y fue empleada en el caso de quistes de alpacas y de cabras para determinar el origen de los mismos.

Determinación de genotipo

El genotipo de *E. granulosus* fue determinado por secuenciación de un fragmento del gen codificante de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (CO1) como fue descrito previamente (Cucher et al., 2011). Las reacciones de secuenciación se realizaron en el servicio de secuenciación de MacroGen Korea (www.macrogen.com).

RESULTADOS

Estudio en humanos

En las zonas estudiadas se observó que 2 de los 36 sueros analizados (5.5%) presentaron serología positiva para hidatidosis por las técnicas de IgG-ELISA y WB (Figura 1). Ambos pacientes de sexo femenino, con edades entre 8 y 10 años, correspondientes a la zona rural de Apóstoles.

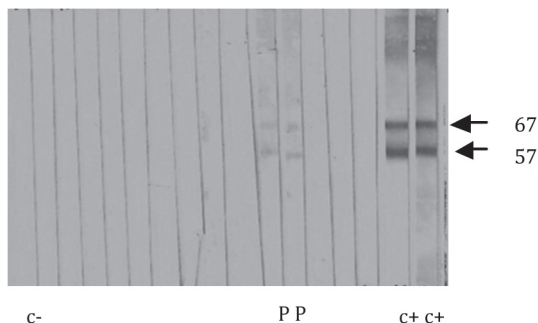


Figura 1: Western blot realizado con los sueros de pacientes de Misiones, indicando los sueros que resultaron positivos (P), el pool de sueros negativos utilizado como control negativo (C-) y el pool de sueros positivos utilizado como control positivo (C+). Las flechas indican el tamaño en kDa de las bandas señaladas.

B. ESTUDIO EN ANIMALES

Quistes bovinos

Dos de los tres quistes de bovinos faenados en Misiones, procedían del Departamento Santo Tomé, región noreste de la provincia de Corrientes. Sólo uno procedía de la región centro de la provincia de Misiones (Tabla 2).

Tabla 2. Procedencia y categorías de los bovinos. Ubicación visceral, número y tamaño de los quistes.

Región de procedencia	Categoría bovinos	Ubicación visceral del quiste	N° de quistes	Tamaño Aproximado (cm)	Condición
Corrientes	novillo	hígado	2	5,5	abscedados
Corrientes	vaca	pulmón	1	15	fértil
Misiones	novillo	pulmón	1	3	infértil

Descripción macro-microscópica del Quiste fértil de origen bovino, categoría vaca.

El quiste de ubicación pulmonar tenía un diámetro aproximado de 15 cm, superficie quística externa de coloración marrón amarillenta (Figura 2) y, al corte, se advertía cavidad ocupada por abundante material líquido, blanco-amarillento, observando membrana. La pared quística poseía consistencia firme, coloración blanquecina; en la cara interna de la cápsula se podían distinguir algunas áreas de engrosamiento y superficie anfractuosa. Al microscopio se observaron abundantes protoescólices, ganchos rostelares y corpúsculos calcáreos.

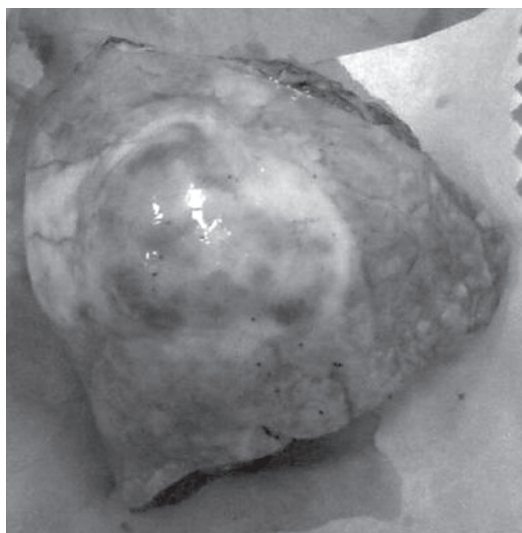


Figura 2. Quiste pulmonar bovino, foto tomada en sala de faena.

Análisis morfométricos

Los valores promedios de la medición de los ganchos rostelares de los protoescólices fueron: LTG: 28,24 μm (26,11 – 30,15 μm); LTP: 22,31 μm (19,58 – 25,33 μm); relación porcentual Hoja / Mango: 66,68 / 33,31, tamaño promedio de protoescólices: 90,82 μm . Estas mediciones son compatibles con *E. granulosus*.

Estudios moleculares

Se logro amplificar sólo uno de los tres quistes analizados (Figura: 3). El genotipo resultó G1.

Quiste de paca

De las 4 pacas analizadas, sólo en una se pudo observar en el hígado seis quistes redondeados de 2 a 3 cm de diámetro, blanquecinos, turgentes al tacto, con contenido líquido (Figura 3).



Figura 3: Presencia de quistes de *E. vogeli* en paca adulta, naturalmente infectada. Provincia de Misiones.

Estudios histológicos y morfométricos

Al corte transversal, se observó en el microscopio óptico que los quistes contenían vesículas prolíferas fértiles con protoescolices y abundantes ganchos rostelares. En los cortes histológicos coloreados se observó reacción fibrosa colágena periquística con infiltración celular, capa laminar y germinativa, esta última con vesículas prolíferas, protoescolices, algunos necróticos, corpúsculos calcáreos y ganchos dispersos (Figura 4).

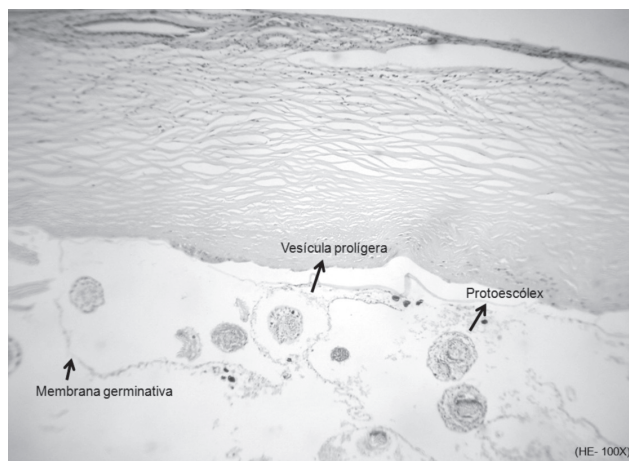


Figura 4. Corte de quiste de *E. vogeli* en paca. Se observan protoescólices, vesícula prolígera, membrana germinativa, reacción colágeno periquística con infiltración celular mínima (coloración hematoxilina-eosina)

Se midieron un total de 35 ganchos rostellares de los protoescólices, obteniéndose los siguientes valores promedios: LTG: 42,8 μm (40-45,5 μm); LTP: 33,5 μm (30-35,5 μm). La proporción de la hoja y el mango fueron 68% y 30% del largo total del gancho, observándose la hoja en forma de garra (Figura 5). Estas mediciones son compatibles con la especie *E. vogeli*. Para comparar los resultados obtenidos, se realizaron mediciones de los ganchos de protoescólices de *E. granulatus*, genotipo G7 (cepa cerdo). Los valores de LTG obtenidos en este caso fueron de LTG: 25 a 31 μm (promedio: 28,9 μm) y LTP, de 20 a 24 μm (promedio: 21,9 μm). Para el análisis estadístico de longitud de ganchos entre ambas especies se utilizó un t-test de Student para muestras independientes. Se verificó la normalidad de la distribución de las muestras con el test de Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) y la homogeneidad de las variancias con el test de Levene ($p > 0.05$). La comparación estadística de los promedios de los ganchos grandes y chicos entre ambas especies mostró diferencias estadísticamente significativas (t test; $p < 0.0001$).

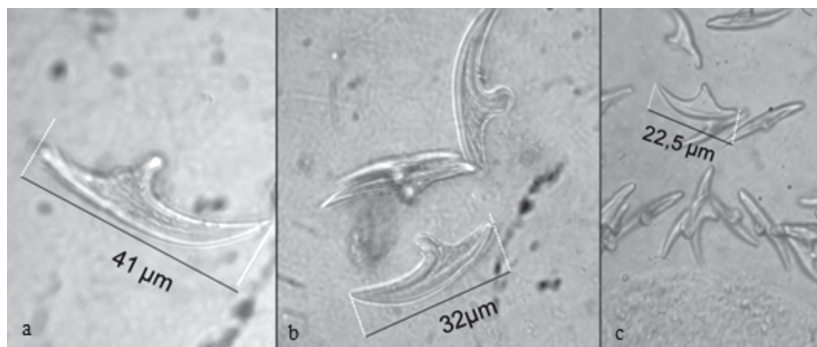


Figura 5. Ganchos rostellares de protoescolices de *E. vogeli* de paca, grandes (a) y pequeños (b). Ganchos de *E. granulatus* en los que se observa su menor longitud respecto a los de *E. vogeli* (c). Aumento 1000X.

Estudios moleculares

Si bien se intentaron diversos métodos de obtención y de amplificación de ADN (varias condiciones de PCR y Nested PCR), no se logró amplificar ADN de *E. vogeli*.

Quiste de coendú

Se observó en bazo un quiste blanquecino, sólido al tacto, de masa homogénea y bordes irregulares. Al estudio por microscopía óptica no se observaron estructuras compatibles con *Echinococcus* spp. A los cortes coloreados con HE se pudo observar: pared quística fibrosa granulomatosa con proceso inflamatorio crónico agudizado y necrosis central y depósitos de pigmentos vinculables a hemorragia residual. Se concluyó que el origen del quiste proviene de un proceso inflamatorio posiblemente bacteriano, que se quistificó, y no de origen parasitario.

Quistes de alpacas y cabras de Perú

Fue amplificado el ADN de las 42 muestras estudiadas (100%). Diecisiete aislamientos (40.5%) fueron identificados como *E. granulatus* genotipo G1, 11 (26.2%) como G6 y 14 (33.3%) como no pertenecientes a *Echinococcus* spp. (Tabla 3). Estos últimos mostraron una identidad nucleotídica >80% con un fragmento del gen COI de *Taenia hydatigena* (JF261330.1).

Tabla 3: Hospedero intermediario, origen geográfico y fertilidad de 42 aislamientos de quistes analizados por PCR dCO1 específica de *E. granulosus*, secuenciación CO1 y el genotipo obtenido.

Código	Hospedero	Origen geográfico	Fertilidad	PCR diferencial (identificación de <i>E. granulosus</i>)	Genotipo
EgAL1	Alpaca	Ayacucho	-	+	G1
EgAL2	Alpaca	Ayacucho	+	+	G1
EgAL3	Alpaca	Ayacucho	+	+	G1
EgAL4	Alpaca	Ayacucho	-	+	G1
EgAL5	Alpaca	Ayacucho	+	+	G1
EgAL6	Alpaca	Ayacucho	+	+	G1
EgAL7	Alpaca	Ayacucho	+	+	G1
EgAL8	Alpaca	Ayacucho	-	+	G1
EgAL9	Alpaca	Puno	+	+	G1
EgAL10	Alpaca	Ayacucho	+	+	G6
EgAL11	Alpaca	Ayacucho	+	+	G6
EgAL12	Alpaca	Ayacucho	+	+	G1
EgAL13	Alpaca	Puno	-	+	G1
EgGO1	Goat	Ica	-	+	G1
EgGO2	Goat	Ica	-	+	G1
EgGO3	Goat	Ica	-	+	G1
EgGO4	Goat	Ica	+	+	G1
EgGO5	Goat	Lima	+	+	G1
EgGO6	Goat	Lima	-	+	G1
EgGO7	Goat	Ica	-	+	G6
EgGO8	Goat	Ica	+	+	G6
EgGO9	Goat	Lima	-	+	G6
EgGO10	Goat	Lima	+	+	G6
EgGO11	Goat	Lima	+	+	G6
EgGO12	Goat	Lima	+	+	G6
EgGO13	Goat	Lima	-	+	G6
EgGO14	Goat	Lima	-	+	G6
EgGO15	Goat	Lima	+	+	G6
NoEgAl1	Alpaca	Ayacucho	-	-	no E*
NoEgAl2	alpaca	Ayacucho	-	-	no E
NoEgAl3	alpaca	Ayacucho	-	-	no E
NoEgAl4	alpaca	Ayacucho	-	-	no E
NoEgAl5	alpaca	Ayacucho	-	-	no E
NoEgAl6	alpaca	Ayacucho	-	-	no E
NoEgAl7	alpaca	Ayacucho	-	-	no E
NoEgAl8	alpaca	Ayacucho	-	-	no E
NoEgAl9	alpaca	Ayacucho	-	-	no E
NoEgAl10	alpaca	Ayacucho	-	-	no E
NoEgAl11	alpaca	Ayacucho	-	-	no E
NoEgAl12	alpaca	Ayacucho	-	-	no E
NoEgAl13	alpaca	Ayacucho	-	-	no E
NoEgAl14	alpaca	Ayacucho	-	-	no E

*No Eg: aislamientos cuya secuencia CO1 no es compatible con *Echinococcus* spp.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para los aislamientos compatibles con *E. granulosus*. Puede observarse que en alpacas el genotipo predominante es G1 y que en cabras es el G6. Ambos genotipos producen quistes fértiles tanto en alpacas como en cabras.

Tabla 4: Hospedero intermediario, número de aislamientos, fertilidad y genotipo de 32 aislamientos de quistes analizados por PCR dCO1 específica de *E. granulosus*, secuenciación CO1 y el genotipo obtenido.

Hospedero	Número de aislamientos	Genotipo	Cociente de Fertilidad *
alpaca	12	G1	8/12
alpaca	1	G6	1/1
cabra	6	G1	2/6
cabra	13	G6	9/13

* Cociente de fertilidad: número de quistes fértiles/número de quistes totales.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha mostrado, por primera vez, la presencia de *E. vogeli* en Argentina. Hasta el momento, su presencia no había sido reportada a pesar de que en la Provincia de Misiones, las condiciones climáticas y la presencia tanto del hospedero intermediario (paca) como del definitivo (perro grullero) sugerían que podría estar presente. La apariencia de los quistes obtenidos de hígado de paca, la presencia de protoescólices, capa germinal y adventicia, así como la longitud de los ganchos rostelares, muestran inequívocamente que dichos quistes pertenecen a *E. vogeli*. Este hallazgo ha sido reportado en la revista Medicina (Vizkaychipi y col., 2013). Por otro lado, se ha mostrado que en Misiones, Argentina, se faenan quistes hidatídicos producidos por *E. granulosus* y que en humanos, existe un 5.5% de prevalencia determinada por serología. Estos resultados sugieren que debe tenerse en cuenta la presencia de más de una especie de *Echinococcus* spp.: *E. vogeli* y *E. granulosus* en la provincia de Misiones, datos que resultan de importancia para la Salud Pública de nuestro país.

Además, como una primera aproximación al estudio epidemiológico de la hidatidosis en regiones de geografía similar a la del NOA, se determinó

que en Perú, las cabras están infectadas principalmente por *E. granulosus* genotipo G6 y en menor medida por G1. Este resultado coincide con lo observado por Soriano y col (2010) en la provincia de Neuquén. Este es uno de los primeros reportes en donde se genotipifican quistes hidatídicos de camélidos americanos y el primero en que se muestra que el genotipo G6 puede infectarlos. Previamente Sánchez y col. (2012) mostraron que 4 quistes provenientes de alpacas de Perú pertenecían al genotipo G1. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que tanto las alpacas como las cabras deben ser tenidas en cuenta en los programas de control de la hidatidosis ya que ambas pueden estar infectadas por genotipos que producen hidatidosis quística en el hombre (Santivañez y col., 2008).

AGRADECIMIENTOS

Karen DeMatteo, University of Missouri-St Louis, USA; Marcia Hellou, INTA Cerro Azul, Misiones; Ariana Gutierrez, Ariel Naidich, Sonia Sosa, Graciela Cespedes, Graciela Santillan, Gerardo Rikoy, Lucia Irazú, Departamento Parasitología INEI-ANLIS "Carlos G. Malbran", Buenos Aires; Elizabeth Husulak, Apóstoles, Misiones; Germán Nocera, Histomarket S.R.L. Pablo O. Sánchez, CYMSA.

ABSTRACT

Hydatid disease is a neglected zoonosis that affects human and animal health, being endemic in several regions of South America. It is caused by platyhelminth parasites of the genus *Echinococcus*. In Misiones, Argentina, very little was known about the *Echinococcus* species/genotypes present in humans and animals. We used morphological and molecular methods to study the situation of hydatid disease in this province. The results obtained showed for the first time that *Echinococcus vogeli* is present in Argentina. Its presence had not been reported before, even though the climatic conditions and the presence of intermediate and definitive hosts suggested that the parasite could be present in Misiones. In addition, we showed that in this province, animals harbouring *Echinococcus granulosus* hydatid cysts are slaughtered and determined 5.5% prevalence of hydatid disease in humans by serological tools. Additionally, since there was a great interest to study hydatid disease

in other endemic countries of South America, we have received several cysts of goat and American camelids from mountainous regions from Perú. The results suggest that goats are infected by *E. granulosus* G6 genotype and, in a less extent, by the G1 genotype; while alpacas were shown to be mainly infected by *E. granulosus* G1 and in minor proportion by *E. granulosus* G6., being both genotypes able to produce hydatid disease in humans. The results of this work will help to the design of Public Health and environmental strategies at the national and regional levels, allowing to improve hydatid disease control.

REFERENCIAS

1. Alvarez Rojas CA, Gauci CG, Lightowlers MW. 2013. Antigenic differences between the EG95-related proteins from *Echinococcus granulosus* G1 and G6 genotypes: implications for vaccination. *Parasite Immunol.* 35, 99-102
2. Boubaker G, Macchiaroli N, Prada L, Cucher MA, Rosenzvit MC, Ziadinov I, Deplazes P, Saarma U, Babba H, Gottstein B, Spiliotis M. 2013. A multiplex PCR for the simultaneous detection and genotyping of the *Echinococcus granulosus* complex. *PLoS Negl Trop Dis.* 7:e2017.
3. Cabrera M, Canova S, Rosenzvit M, Guarnera E. 2002. Identification of *Echinococcus granulosus* eggs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 44, 29-34.
4. Chebez JC. Zorro pitoco. En: Los que se van. Fauna Argentina Amenazada. Albatros, 1° Edición. Buenos Aires Argentina, 2008, p. 84-89.
5. Coura R, C Prolla J, Meurer L, Ashton-Prolla P. 2005. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 58, 894-895.
6. Cucher, M., L. Prada, G. Mourglia-ettlin, S. Dematteis, F. Camicia, S. Asurmendi and M. Rosenzvit. 2011. Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *Int J Parasitol* 41, 439-448.
7. DeMatteo KE, Loisel BA. 2008. New data on the status and distribution of the bush dog (*Speothos venaticus*): evaluating its quality of protection and directing research efforts. *Biological Conservation* 141, 2494-2505.
8. Druwa P. 1977. Beobachtungen zur Geburt und natürlichen Aufzucht von Waldhunden (*Speothos venaticus*) in der Gefangenschaft. *Zoologische Garten (N.F.)* 47, 109-137.
9. Hüttner M, Nakao M, Wassermann T, Siefert L, Boomker JD, Dinkel A, Sako Y, Mackenstedt U, Romig T, Ito A. 2008. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* Ortlepp, 1937 (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *International Journal for Parasitology* 38, 861-868.
10. Kamenetzky, L., A. M. Gutierrez, S. G. Canova, K. L. Haag, E. A. Guarnera, A. Parra, G. E. Garcia and M. C. Rosenzvit 2002. Several strains of *Echinococcus*

- granulosus* infect livestock and humans in Argentina. Infect Genet Evol 2, 129-136.
11. Naidich A, McManus DP, Canova SG, Gutierrez AM, Zhang W, Guarnera EA, Rosenzvit MC. 2006. Patent and pre-patent detection of *Echinococcus granulosus* genotypes in the definitive host. Mol Cell Probes 20, 5-10.
 12. Oriol R, Williams JF, Pérez Esandi MV, Oriol C. 1971. Purification of lipoprotein
 13. antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. Am J Trop Med Hyg. 20, 569-74.
 15. Rausch RL, D'Alessandro A, Rausch VR. (1981) Characteristics of the larval *Echinococcus vogeli* Rausch and Bernstein, 1972 in the natural intermediate host, the paca, *Cuniculus paca* L. (Rodentia: Dasyproctidae). Am J Trop Med Hyg. 30, 1043-52.
 16. Rausch RL, Rausch VR, D'Alessandro A. 1978. Discrimination of the larval stages of *Echinococcus oligarthrus* (Diesing, 1863) and *E. vogeli* Rausch and Bernstein, 1972 (Cestoda: Taeniidae). Am J Trop Med Hyg. 27, 1195- 1202.
 17. Rosenzvit, M. C., L. H. Zhang, L. Kamenetzky, S. G. Canova, E. A. Guarnera and D. P. McManus. 1999. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. Parasitology 118, 523-530.
 18. Sánchez E, Cáceres O, Náquira C, Miranda E, Samudio F, Fernandes O. 2012. *Echinococcus granulosus* genotypes circulating in alpacas (*Lama pacos*) and pigs (*Sus scrofa*) from an endemic region in Peru. Mem Inst Oswaldo Cruz. 107, 275-8.
 19. Santivañez SJ, Gutierrez AM, Rosenzvit MC, Muzulin PM, Rodriguez ML, Vasquez JC, Rodriguez S, Gonzalez AE, Gilman RH, Garcia HH (2008) Cysticercosis Working Group in Peru. Human hydatid disease in Peru is basically restricted to *Echinococcus granulosus* genotype G1. Am J Trop Med Hyg. 79:89-92.
 20. Soriano SV, Pierangeli NB, Pianciola L, Mazzeo M, Lazzarini LE, Saiz MS, Kossman AV, Bergagna HF, Chartier K, Basualdo JA. 2010. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates indicates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquén, Patagonia Argentina. Parasitol Int. 59, 626-8.
 21. Velázquez J, Astudillo GO, Di Risio C, Etchart C, Chertcoff AV, Perissé GE, Carnevale S. 2011. Molecular characterization of *Cystoisospora belli* and unizuite tissue cyst in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. Parasitology 138, 279-86.
 22. Vizcaychipi KA, Céspedes G, Santillan G, Guarnera E, D'Alessandro A. Huéspedes del ciclo Silvestre de *Echinococcus vogeli* en la Provincia de Misiones, Argentina. XXIV Jornadas Argentinas de Hidatidosis, 2007, Resumen 19, San Juan, Argentina.
 23. Vizcaychipi KA, DeMatteo K, D'alessandro, A. Bush Dog "Perro Grullero", Pacas. Polycystic Echinococcosis In Misiones, Argentina?. XXIII Congreso Mundial De Hidatidología AIH, 2009, Colonia Del Sacramento, Uruguay.
 24. Vizcaychipi KA, Helou M, DeMatteo K, Macchiaroli N, Cucher M, Rosenzvit M, D'Alessandro AE. 2013. Primera identificación de *Echinococcus vogeli* en una paca en la provincia de Misiones, Argentina. Rev Argent Microbiol. 45, 137-141.

INTERACCIÓN ENTRE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RUNX1 Y FOXP3: POTENCIAL MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ONCOGENES EN GLÁNDULA MAMARIA NORMAL Y TUMORAL

Natalia Rubinstein

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

INFORME FINAL

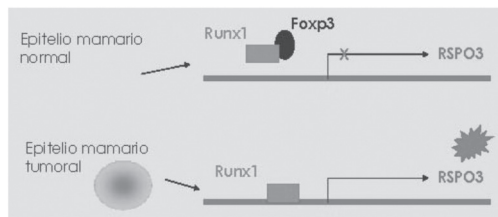
Introducción

La capacidad de predecir el comportamiento de los tumores sólidos nos permite seleccionar tratamientos más acertados y mejores estrategias para el seguimiento y la cura de la enfermedad. Usualmente, el volumen tumoral, la detección de metástasis en los ganglios centinelas y los patrones histológicos son usados como herramienta para determinar el pronóstico de la enfermedad, su tratamiento o incluso la posibilidad de recidivas. El descubrimiento de numerosos marcadores genéticos y alteraciones bioquímicas en diversos tumores dio lugar a la era molecular de los factores de pronóstico. Muchos de estos cambios moleculares son determinantes en las características biológicas relevantes del tumor, como alta tasa de proliferación, invasividad, metástasis, etc. El cáncer de mama es considerado, en gran parte, el resultado de la acumulación de múltiples alteraciones genéticas que dan lugar a la pérdida de genes supresores de tumor y/o a la sobre-expresión de oncogenes. En nuestro laboratorio, liderado por la Dra Kordon, hemos reportado la inserción del virus MMTV río arriba del gen RSPO3 en tumores mamarios y observado que esta mutación induce la sobre-expresión de dicho gen en estas neoplasias. Datos de nuestro laboratorio revelan que esta proteína es capaz de inducir la formación de focos y de formar colonias cuando es sobre-expresado en células normales NIH3T3. Finalmente, células epiteliales mamarias normales de ratón transfectadas con un vector de expresión conteniendo la secuencia completa de RSPO3 tienen la capacidad de establecer tumores al ser inoculadas en ratones singéneos¹. Con el objetivo de explorar los mediadores involucrados en la regulación de la expresión de RSPO3 en epitelio mamario, analizamos su secuencia promotora en búsqueda de potenciales sitios de unión

para factores de transcripción. Como resultado obtuvimos 3 sitios putativos para la actividad transcripcional de RUNX1. RUNX1 pertenece a una familia de factores de transcripción (RUNX) que han sido descritos como reguladores esenciales del desarrollo celular pero su funcionalidad durante la progresión tumoral no ha sido aún completamente dilucidada dado que varía según el contexto molecular. Se los ha encontrado asociados principalmente en la hematopoyesis embrionaria y profundamente involucrados en la generación de leucemias. Sakaguchi y colaboradores demostraron que RUNX1 activa genes determinantes durante la regulación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T. En ese trabajo analizan la inhibición de la actividad de RUNX1 mediada por la interacción proteica con FOXP3 en linfocitos T regulatorios. Ellos describen que la presencia de FOXP3 activo determina la generación de linfocitos T regulatorios mediante el bloqueo de la actividad de RUNX1, el cual regula la transcripción de genes relevantes de la subpoblación de linfocitos T (CD4). Por otro lado, Liu y colaboradores describieron que el factor de transcripción FOXP3 actúa como gen supresor de tumor de mama al inhibir directamente la expresión del oncogen Erb2 y SKP2. En su trabajo describen que las células epiteliales normales expresan altos niveles de FOXP3 comparado con las células tumorales de mama. Nuestro análisis *in silico* de la zona promotora de RSPO3 reveló la ausencia de potenciales sitios de interacción para la actividad supresora de FOXP3 en su secuencia regulatoria. Por lo dicho anteriormente, consideramos muy interesante investigar los posibles mecanismos de regulación de la expresión génica de proteínas generadoras de tumores de mama, en particular el oncogen RSPO3, a través de la interacción de dos factores de transcripción, RUNX1 y FOXP3. El conocimiento de estos mecanismos nos permitirá establecer nuevos marcadores y estrategias para combatir la progresión del cáncer de mama.

Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio muestran que existe una correlación inversa entre la expresión de RSPO3 y FOXP3 en células mamarias normales, mientras que los niveles de expresión de RUNX1 no se verían modificados en células mamarias normales y tumorales. Además hemos demostrado que RUNX1 es capaz de unirse a la zona promotora de RSPO3 sugiriendo una posible participación en la regulación de su transcripción. Teniendo en cuenta que la secuencia promotora de RSPO3 presenta sitios putativos para el factor de transcripción RUNX1, pero no para FOXP3 y que este último es capaz de inhibir (a través del contacto proteína-proteína) la actividad de RUNX1, nosotros proponemos que la actividad supresora de

FOXP3 en tumores mamarios no se limitaría a su acción directa sobre determinados promotores, sino también a la acción indirecta, por el bloqueo de otros factores de transcripción como RUNX1.



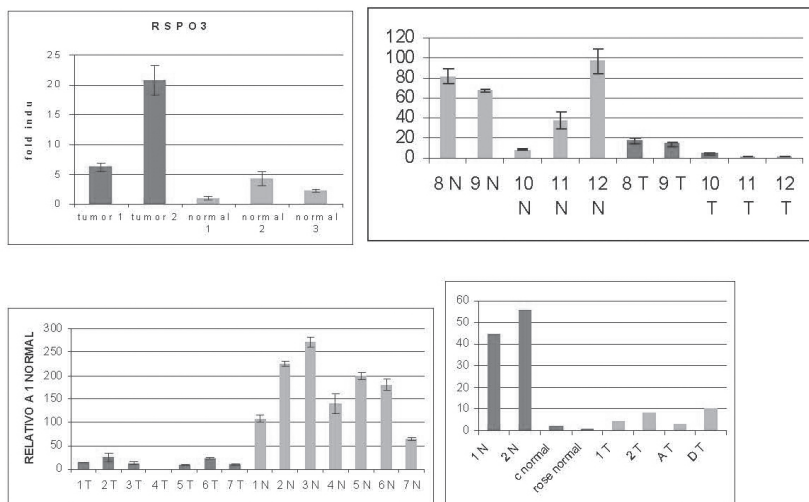
Los objetivos específicos a concretar fueron:

- 1-Investigar la capacidad de RUNX1 de activar la transcripción de genes relevantes durante la tumorigénesis mamaria, particularmente RSPO3.
- 2-Analizar la capacidad del factor de transcripción FOXP3 de modular la actividad transcripcional de RUNX1 en células epiteliales mamarias.
- 3-Determinar los efectos de modificar el balance FOXP3/RUNX1 en la expresión de genes blanco como Rspo3 y en el desarrollo tumoral.

RESULTADOS

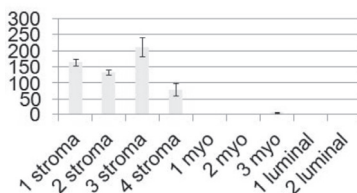
Análisis de la expresión de RSPO3 en mama normal y tumoral humana:

Con el objetivo de evaluar si RSPO3 está alterado en mama tumoral evaluamos su nivel de expresión mediante la técnica qPCR. Para ello utilizamos muestras de glándula mamaria normal humana extraídas a través de mamoplastias, extrajimos RNAi y realizamos transcripción reversa para generar cDNA. A partir de muestras de tejidos de tumores mamarios congelados realizamos el mismo procedimiento para obtener cDNA. Ambos tipos de muestras fueron cedidos por la Dra Cathrin Brisken, EPFL, Lausanne, Suiza. La figura 1 (a-d) nos muestra que, contrario a lo esperado, los tejidos normales expresan grandes cantidades de RSPO3 comparadas con los tejidos normales.



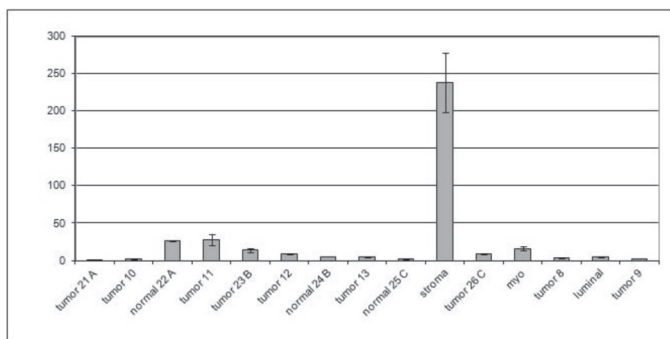
Dado que la glándula mamaria posee en su arquitectura varias subpoblaciones celulares separamos estos componentes utilizando marcadores específicos mediante la técnica de *cell sorting*. En la **figura 2 (a)** podemos observar que son las células estromales y no las epiteliales aquellas que expresan altos niveles de RSPO3, mientras que en las epiteliales es significativamente menor. En la **figura 3** podemos ver niveles comparativos variables de RSPO3 en todos los tipos celulares comparados con el tejido tumoral. Estos resultados explican por qué encontramos esa diferencia al trabajar con tejidos normales completos, mientras que los tejidos tumorales son mayormente epiteliales.

Figura 3. Estroma: células estromales. Myo: células mioepiteliales. Luminal: células lumbales.



La **figura 4** muestra los niveles comparativos de RSPO3 en células normales (stroma, myo y lumi) comparadas con las tumorales. En este ejemplo puede verse que las células estromales expresan altos niveles de RSPO3 comparado con el resto de las muestras. Durante el 2do año intentaremos dilucidar más características de la glándula mamaria normal para poder establecer un patrón normal/tumoral en la expresión de RSPO3 en humanos.

Figura 4



Evaluación de la expresión de Runx1 y Foxp3 en diferentes estadios de glándula mamaria de ratón

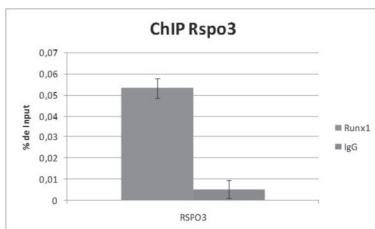
En consecuencia con los resultados mostrados en humanos decidimos planificar para el 2do año la tinción por inmunohistoquímica de RSPO3 en tejidos de glándula mamaria normal y tumoral de ratón. Además, dado que RUNX1 y FOXP3 también se expresan en tejidos inmunológicos, la realización de qPCR a partir de glándula mamaria completa podría dar lugar a falsos positivos debido a la presencia de células inmunes infiltrantes, especialmente en el estadio de involución mamaria post-lactancia. Por lo tanto también realizaremos inmunohistoquímica para evaluar la presencia y localización de la expresión de estos genes.

Estudio de la expresión de Rspo3 mediante la actividad transcripcional de Runx1

Con el objetivo de evaluar si Runx1 endógeno es capaz de unirse al promotor de Rspo3, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en la línea mamaria tumoral murina LM3. La **figura 1** muestra que Runx1 endógeno es capaz de unirse al promotor de Rspo3 en un con-

texto fisiológico, confirmando lo predicho por el ensayo de *gelshift* realizado previamente en el laboratorio (ver presentación a carrera).

Figura 1. Ensayo de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP) en células LM3. Se compara la unión al promotor de Rspo3 utilizando un anticuerpo específico contra Runx1 o un anticuerpo contra IgG de ratón. N=4 y cambio mayor a 10 veces entre Runx1 e IgG.



Para explorar si la interacción de RUNX1 con el promotor de RSPO3 es funcional se realizaron los siguientes experimentos:

- Células epiteliales normales de mama murina (línea celular SCP2) fueron transfectadas con un vector de expresión conteniendo la secuencia completa de cDNA de RUNX1 bajo el control del promotor CMV (gentilmente cedido por el Dr Lucio Castilla, UMASS, USA). En la **Figura 2** podemos observar que el aumento de la expresión de RUNX1 esta acompañado por un aumento en la expresión de RSPO3.

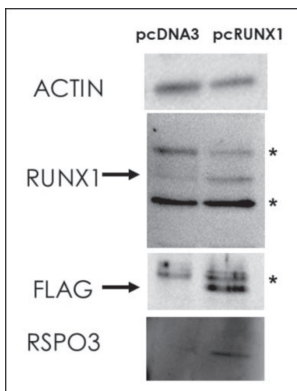
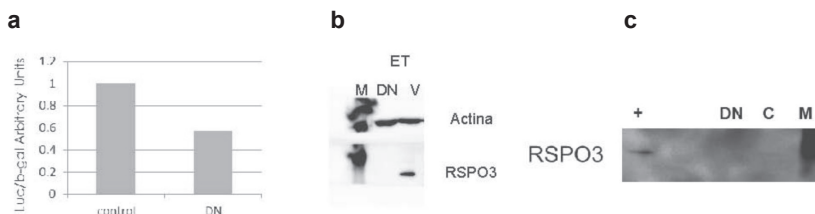


Figura 2: WB de células transfectadas con vector vacío (pcDNA3) o vector de expresión de RUNX1 (pcRUNX1). Flag control positivo de transfección con Runx1 exógeno. Asterisco representa bandas inespecíficas.

• Células epiteliales tumorales de mama murina (línea celular LM3) fueron transfectadas con un vector de expresión conteniendo la secuencia truncada de Runx1 (gentilmente cedido por Dr Lucio Castilla, UMASS, USA). Este plásmido contiene una versión de la secuencia de RUNX1 con un codón STOP en la región codificante para la zona de transactivación. De esta manera, una vez expresado en la célula tumoral, esta proteína truncada heterodimeriza con la proteína salvaje RUNX1 bloqueando su actividad transcripcional. Es decir, funciona como un dominante negativo (DN). Mediante la co-transfección de un vector reportero conteniendo la secuencia de pegado de Runx1 rio arriba del gen luciferasa pudimos corroborar una disminución cercana al 50% de su actividad transcripcional (**Figura 3a**). Finalmente, la disminución de la actividad transcripcional de Runx1 fue acompañada por una disminución de la expresión de RSPO3 en esta línea tumoral tanto en extractos proteicos totales (ET) (**Figura 3b**) como en los medios condicionados generados por las células transfectadas (**Figura 3c**). Actualmente estos mismos ensayos se están desarrollando en otra línea tumoral de mama murina, SCG6.

Figura 3: a) Actividad transcripcional de Runx1; b) WB de RSPO3 en extractos totales (ET); c) WB de RSPO3 en medios condicionados (MC). Estos resultados sugieren que Runx1 es capaz de modular, directa o indirectamente, la expresión del oncogen RSPO3 en mama normal y tumoral.



El siguiente paso consistió en evaluar si la disminución en la actividad de Runx1 y su consecuente disminución en la expresión de RSPO3 tiene un efecto en la actividad funcional (proliferación, muerte, capacidad migratoria) de la célula tumoral. La disminución de la actividad de Runx1 no produjo un cambio fenotipo observable en las células tratadas al compararlas con las células control, mientras que el número de células sí se vio reducido comparado con las células control (**figura 4**).

Figura 4. Cuantificación del número de células LM3 luego de la transfección con el plásmido DN Runx1 (DN) y su respectivo control (V). Se contaron las células al microscopio antes y después de la transfección en 5 experimentos independientes (N=5) y Prueba T con $p=0,0007$

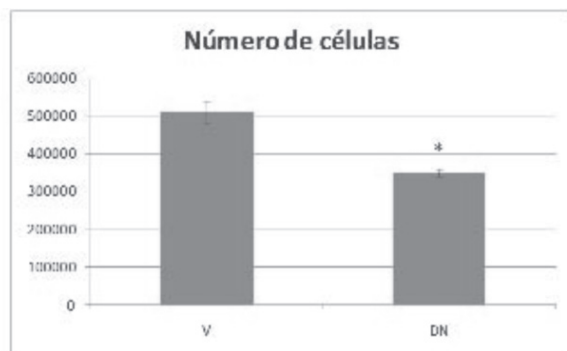
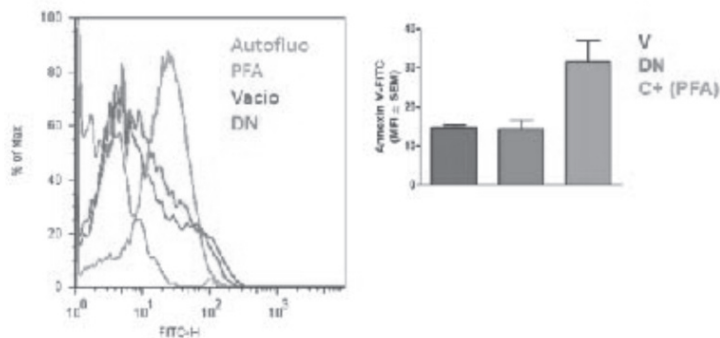


Figura 5: Izquierda, histograma representativo (PFA: paraformaldehído usado como control positivo, Vacío: (V) vector vacío) y DN: vector conteniendo dominante negativo). Derecha: gráfico de

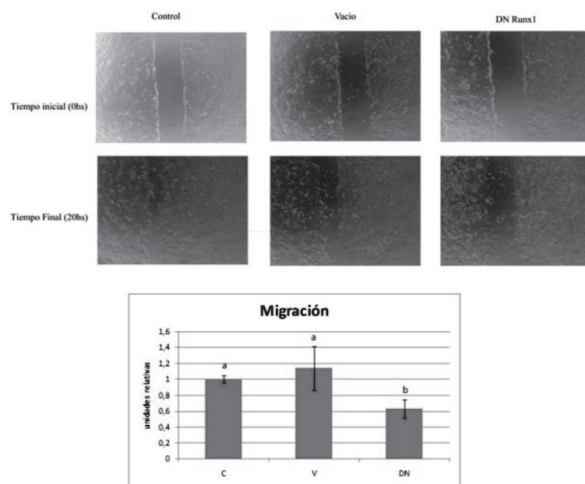


En la **figura 5** podemos observar que esta reducción en el número de células no se debe a un aumento en los niveles de apoptosis.

Este resultado sugiere que la disminución en la actividad de Runx1 podría estar afectando el ciclo celular de LM3 reduciendo su capacidad de proliferación. Más experimentos son necesarios para confirmar esta afirmación.

La *capacidad migratoria* de la célula tumoral es una característica relevante que define la posibilidad de hacer metástasis. Con el objetivo de investigar si Runx1 tiene alguna participación en este proceso realizamos ensayos de migración por medio de la técnica de cierre de la herida. Como se muestra en la **figura 6**, el bloqueo de la actividad de Runx1 disminuye significativamente la capacidad de migración de las células LM3.

Figura 7. Ensayo de migración en células LM3 luego de la transfección con el DN de Runx1. a-Foto representativa del ensayo de migración (células control sin transfectar, células transfectadas con plásmido Vacío o plásmido DN Runx1) al tiempo inicial y al tiempo final. b-Cuantificación y estadística, $n=4$ y ANOVA de 1 factor con contrastes a priori C vs V $p>0,05$, C y V vs



Este resultado sugiere que **Runx1 podría estar modulando la capacidad migratoria de las células LM3**. Más experimentos son necesarios para analizar el mecanismo utilizado.

Evaluación de la interacción y localización de Runx1 y Foxp3

Como fue explicado en la introducción, Sakaguchi y colaboradores demostraron que las células T reguladoras, que expresan RUNX1 y FOXP3, tienen la capacidad de bloquear la actividad transcripcional de RUNX1 a través de la interacción física con FOXP3. Esta interacción proteína-proteína

inhibe a RUNX1 polarizando a la célula hacia un fenotipo inhibitorio en el contexto inmunológico. Con el objetivo de explorar si la interacción entre Runx1 y Foxp3 también ocurre en células de mama normal realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación. En la **Figura 8** mostramos la capacidad de RUNX1 y FOXP3 de interactuar físicamente *in vivo* en células epiteliales normales murinas (SCP2). A través de tinciones y observación en confocal demostramos que esta interacción podría estar ocurriendo en el núcleo (**Figura 9**).

Figura 8: PreIP: extracto proteico previo a la incubación con el anticuerpo específico anti-FOXP3; SN: sobrenadante conteniendo extracto proteico post-incubación con anti-FOXP3; IP: extracto proteico conteniendo las proteínas precipitadas unidas a FOXP3.

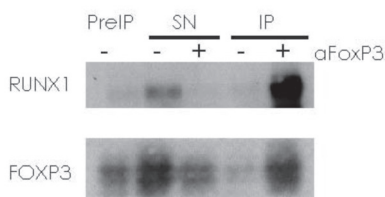
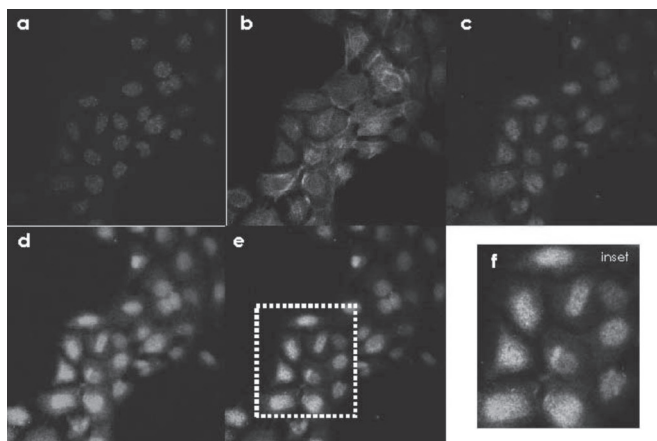
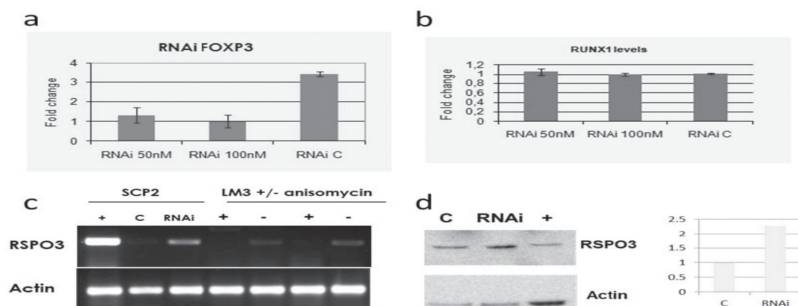


Figura 9. A) Tinción de núcleos con DAPI B) Tinción de citoesqueleto con faloidina C) Tinción de FOXP3 D) Tinción de RUNX1 E) Merge o superposición de imágenes c+d. F) Amplificación del *inset* **INHIBICIÓN DE LA EXPRESION DE FOXP3**



Para evaluar la capacidad de FOXP3 de modular la expresión de genes regulados por RUNX1 en mama normal, bloqueamos in vitro la expresión de FOXP3 en un modelo murino. Para ello transfectamos en forma transiente la línea de epitelio normal de mama SCP2 con un RNAi específico para FOXP3 o RNAi control (Invitrogen). La **figura 10 (a)** muestra que el RNAi es eficiente en disminuir los niveles de expresión de FOXP3 comparado con el RNAi control (qPCR). La **figura 10 b** muestra que los niveles de expresión de Runx1 no se ven alterados frente a la disminución de FOXP3, mientras que la **c y d** muestran que la disminución de la expresión de FOXP3 se ve acompañada por un aumento en los niveles de expresión de RSPO3 (RT-PCR y WB. Por otro lado, ha sido demostrado que la droga anisomicina es capaz de aumentar los niveles de Foxp3 en células epiteliales¹³. La **figura 10 c** muestra que cuando las células LM3 son tratadas con esta droga los niveles de expresión de RSPO3 se ven aumentados (RT-PCR).

Figura 10: a-b) qPCR de FOXP3 y de RUNX1; c) RT-PCR de RSPO3 y Actina; d) WB de RSPO3 y actina, y cuantificación de la densitometría de d).



Estos resultados sugieren que FOXP3 podría estar regulando la actividad transcripcional de RUNX1 y de esta manera alterar la expresión de RSPO3.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1) RSPO3 se expresa solo en células epiteliales mamarias tumorales (humanas y murinas). 2) Runx1 es capaz de unirse al promotor de RSPO3 y regular positivamente su transcripción en células tumorales murinas 3) La

falta de actividad transcripcional de Runx1 reduce la proliferación y migración tumoral, sin inducir apoptosis. 4) Runx1 y Foxp3 son capaces de interactuar en el núcleo de una célula epitelial normal murina 5) Foxp3 reprime la transcripción de RSPO3 en células epiteliales mamarias murinas normales.

Estos resultados están incluidos en un manuscrito que será enviado a fines de este año a una revista especializada en investigación oncológica. Actualmente estamos finalizando un último experimento que conecta la actividad transcripcional de Runx1 con la actividad supresora de FOxp3. Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que al reducir los niveles de expresión de Foxp3 en células epiteliales normales (siRNA) los niveles de actividad de Runx1 (medidos con un reportero de la actividad transcripcional de Runx1 cedido gentilmente por Dr Lanja Vazarevic del NIH, USA) son reducidos.

PRESENTACIONES A CONGRESO DURANTE EL PERIODO:

1. **Estudio de runx1 como potencial regulador de tumorigénesis en glándula mamaria.** MS Recouvreux, L Rocha-Viegas, E Kordon, P Echeverría, **N Rubinstein**. (Poster, Congreso SAIC 2011. Mar del Plata, Argentina).
2. **La expresión de r-spondin 3 se asocia con los niveles de beta-catenina en células mamarias.** Tocci J, Goddío M, **Rubinstein N**, Tanos T, Briskén C, Kordon E. Poster, Congreso SAIC 2011. Mar del Plata, Argentina.
3. **Runx1 and Foxp3 interaction: potential mechanism of oncogene regulation in mammary gland.** MS Recouvreux, E Grasso, P Echeverría, L Castilla, E Kordon, **N Rubinstein**. SISTAM, the First South American Spring Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine. Los Cocos, Córdoba -October 2010.

TESINA DIRIGIDA EN EL MARCO DE ESTE PROYECTO:

2010-2012 Licenciatura en Ciencias Biológicas (FCEN-UBA) de la estudiante Sol Recouvreux. Título: Participación de los factores de transcripción Runx1 y Foxp3 en un potencial mecanismo de regulación de la expresión de oncogenes en glándula mamaria. Calificación: 10.

Este proyecto dio lugar a la obtención de la prestigiosa beca UBA Estímulo para desarrollar la tesina de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la estudiante Sol Recouvreux. (07-2011/122012) bajo la dirección de Natalia Rubinstein.

EVALUACIÓN DE LA LECTINA LIGADORA DE MANOSA (MBL) EN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES INTERNADOS CON CONFIRMACIÓN DE INFECCIÓN POR H1N1 2009

Ruvinsky Silvina, Gurevich Juan, Monaco Andrea, PerezGuadalupe, Sen
Luisa, Bologna Rosa, Mangano Andrea
Hospital de Pediatría Dr. Juan P. Garrahan

INTRODUCCIÓN:

Los virus de Influenza A pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y sus subtipos se los denomina de acuerdo a la hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N). Al presente se han descripto 16 subtipos HA (H1-H16) y 9 NA (N1-N9). Estos virus presentan una estructura compleja y están recubiertos por una membrana lipídica que proviene de la célula hospedadora. Esta envoltura alberga a la hemaglutinina, neuraminidasa y a las proteínas M2 que se proyectan desde la superficie del virus¹

El virus de la Influenza A H1N1 usualmente afecta a cerdos pero ocasionalmente cruza las barreras de las especies y produce infección en humanos^{2,3}.

La pandemia que se inició en Marzo del 2009 fue causada por un virus de Influenza A (H1N1) que no había sido reconocido previamente en cerdos o humanos, aunque 6 de sus 8 segmentos genéticos fueron similares a los detectados previamente. Esta cepa representa una combinación de dos cepas de cerdo (norteamericana y euroasiática), una cepa humana y una aviaria (norteamericana).

La pandemia causada por el virus de la influenza H1N1 2009 causo globalmente mas de 18449 fallecidos en al menos 214 países⁴. En Argentina el primer caso de Influenza A (H1N1) fue detectado el 17 de mayo del 2009 en todo el país se reportaron 3.056 casos confirmados por laboratorio con 137 pacientes fallecidos⁵.

Los niños pequeños (menores de 5 años) tienen un riesgo aumentado de complicaciones por influenza.⁶ El espectro de la enfermedad va desde enfermedad del tracto respiratorio superior hasta neumonía grave o fatal.

Durante el 2009, las complicaciones reportadas en la pandemia por Influenza A H1N1 fueron principalmente la neumonía rápidamente progresi-

va, falla respiratoria y SDRA (síndrome de distress respiratorio del adulto)⁷. Se ha reportado que los pacientes con enfermedad de base o comorbilidades asociadas, los adultos jóvenes y los niños pequeños tienen mayor riesgo de complicaciones por la infección y de evolución a formas graves.⁸⁻⁹ Existen distintos mecanismos inmunológicos que se pueden relacionar con las posibles distintas evoluciones clínicas de los pacientes afectados por este virus.

La variabilidad en la respuesta a enfermedades infecciosas puede deberse a variaciones genéticas propias de cada individuo. Actualmente, se reconoce que tanto variaciones cualitativas (polimorfismos, mutaciones) como cuantitativas (dosis génicas), especialmente en los genes relacionados con el sistema inmune juegan un rol clave en la variabilidad inter-individual.

La deficiencia de MBL está asociada a la presencia de variaciones genéticas en la región estructural (alelos B, C y D) y promotora del gen *mbi2* (alelo X).¹⁰⁻¹² La combinación de distintas variantes define 2 grupos en relación con la concentración de la proteína en plasma i) suficientes: XA/YA, YA/YA, YA/YO, XA/XA; ii) insuficiente: YO/YO, XA/YO y iii) bajas de MBL.

Variaciones genéticas en la proteína ligadora de manosa (MBL), componente de la inmunidad innata, se han asociado con un mayor riesgo a contraer determinadas infecciones en especial durante el período vulnerable de la niñez. La MBL es una molécula con funciones en la primera línea de defensa del huésped. La deficiencia de MBL ligada al polimorfismo genético en MBL2 está asociado con un incremento en la susceptibilidad a infecciones por virus respiratorios¹³⁻¹⁹.

Analizar de la variabilidad genética de MBL2 y su relación en la evolución de la infección por H1N1 2009 en niños hospitalizados es de utilidad para el futuro desarrollo e implementación de nuevas intervenciones terapéuticas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Explorar la participación de la MBL- componente clave de la inmunidad innata- en la evolución clínica de la infección por el virus de Influenza A H1N1 2009 en niños internados

Objetivos Específicos:**ETAPA 1:**

- Identificar los genotipos de MBL en niños con infección confirmada por Influenza A H1N1 de circulación en Argentina durante 2009
- Describir las frecuencias genotípicas, alélicas y los haplotipos presentes.
- Comparar las frecuencias halladas en los grupos de estudio con población general
- Describir las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes internados con infección confirmada por Influenza A (H1N1) con distintos genotipos de MBL.

ETAPA 2:

- Determinar los niveles circulantes de MBL
- Evaluar en forma conjunta los resultados obtenidos de la genotipificación de las variantes de la MBP y los niveles de MBP en suero y las características clínicas de los pacientes evaluados

METODOLOGÍA:

Se realizó un estudio exploratorio de cohorte retrospectiva de pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de infección por H1N1 2009 confirmada con o sin enfermedad de base internados en el Hospital de Pediatría Dr. Juan P. Garrahan

Para realizar la comparación de la frecuencia de genotipos de MBL en los casos se evaluaron como control a un grupo de 132 donantes adultos de sangre del Hospital Garrahan.

Mediante una planilla de registro se incluyeron las siguientes variables: edad, sexo, enfermedad de base, días de internación por episodio. Síntomas clínicos iniciales, requerimientos de oxígeno suplementario, ingreso a Unidad de cuidados intensivos, Asistencia respiratoria mecánica.

Muestras clínicas

Se obtuvieron 5 ml de sangre entera con EDTA al 10%. Se separó el plasma y se conservó a -20°C. De la fracción restante se lisaron los glóbulos rojos y se procedió a la extracción de ADN celular mediante la técnica de precipitación salina.

Genotipificación de MBL

Los genotipos de MBL se identificaron mediante ensayos de PCR-RFLP ya desarrollados en el laboratorio de BCyR. Brevemente, con primers específicos para la región estructural se amplificó un producto de 349pb el cual fue sometido a digestión con las enzimas de restricción *BanI* y *MboI*. *BanI* cliva los alelos A, C, y D en 2 fragmentos de 260 y 89 bp dejando al alelo B sin digerir. Por otra parte, la enzima *MboI* sólo clivó el alelo C allele en 2 fragmentos de 279 y 70pb. Para identificar el alelo D, se amplifica un fragmento de 398 bp y se digiere con la enzima *HhaI*, la cual cliva el alelo A en dos fragmentos de 355 y 43pb, sin cortar al alelo D. La identificación de la variante en la región promotora X/Y se realizó una PCR de sitio dirigida (SDM) la que genera un fragmento de 328bp y se introduce un sitio de restricción para la enzima *SacII* para el alelo Y. La enzima cliva el alelo Y en dos fragmentos de 296 y 32pb, dejando sin digerir al alelo X.

Medición de MBL

La medición de MBL se realizó en muestras de plasma o suero, las cuales fueron conservadas a -20°C . Los niveles de MBL se midieron mediante un ensayo comercial de ELISA que detecta oligómeros de MBL (Antibody Shop). Las placas de ELISA están recubiertas con un anticuerpo monoclonal dirigido hacia el dominio de unión a biotina. La detección final de la reacción se realizó por métodos colorimétricos. El límite de detección del ensayo fue de 50ng/mL.

Para el análisis estadístico se utilizó el test exacto de Fisher como variante del test de χ^2 -cuadrado, dado el pequeño número esperado de casos para comparar la prevalencia de DNA emia en ambos grupos.

Para el análisis de las características clínicas y su asociación con la suficiencia o insuficiencia de MBL2 se utilizó el t-test o test de Wilcoxon según correspondiese para las variables continuas y para las variables categóricas se utilizó Chi-cuadrado o Test de Fisher, dependiendo del tamaño muestral. Para el análisis se utilizó el paquete estadístico STATA 8.0.

Previo a la inclusión de todos los pacientes se obtuvo consentimiento informado firmado por sus padres o tutores. El protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital de Pediatría Dr. Juan P. Garrahan.

RESULTADOS:

Características generales de la población evaluada:

Fueron incluidos un total de 51 pacientes con infección confirmada por H1N1 2009, la mediana de edad fue de 40 meses (RIC IQR: 11-120 meses), un 37.2% de los pacientes eran menores de 24 meses de edad.

El 66.7% de sexo masculino y el 33% (n=17 pacientes) eran pacientes inmunocomprometidos (14 pacientes con enfermedad oncohematológica y 3 con infección HIV-1).

La mediana de días de internación en los casos analizados fue de 7 días (RIC: 7-14 días).

Los síntomas clínicos de presentación fueron: fiebre 90% (n= 46 pacientes), tos 100% (n=51 p), vómitos 23.5% (n=12 p) y diarrea 11.7% (n=6 p).

El 53% (n= 27pacientes) requirió aporte de oxígeno, la mediana de días de oxígeno suplementario fue de 1 día (RIC 0-9 días).

El 19.6% (n= 10) requirieron en la unidad de cuidados intensivos y tratamiento con asistencia respiratoria mecánica (ARM), la mediana de días de ARM fue de 6.5 días (RIC: 1.5- 12.5 días). Los motivos de ingreso a UCI más frecuentes fueron: distress respiratorio (SDRA), claudicación respiratoria inminente aguda (CRIA) y /o dificultad respiratoria grave. Todos los pacientes recibieron tratamiento antiviral con oseltamivir durante 5 días.

Análisis de los genotipos de MBL2 en los casos y los controles evaluados

En la tabla 1 se puede observar la distribución de genotipos de MBL2 analizada en los 51 casos ingresados en el estudio y en los 132 controles de banco de sangre analizados.

La distribución según genotipo en los casos y controles fue A/A 53% vs. 62%, A/O heterocigotos 37% vs. 33%, and O/O homocigotas 10 vs 4.5%, respectivamente.

La distribución de genotipos hallada de MBL2 fue muy similar tanto en los casos como en los controles.

En ocho pacientes (15.7%) se confirmó déficit de MBL (XA/O ó O/O) mientras que en 43 pacientes (84.3%) se halló suficiencia de MBL según los genotipos aislados (YA/YA, YA/XA, XA/XA ó YA/O)

Tabla 1. Distribución de genotipos de MBL2 en casos de H1N1 y controles

Genotipos de MBL2	Pacientes con H ₁ N ₁ 2009	Grupo Control
Estructural		
A/A	27/51 (52.9)	82/132 (62.1)
Todos A/O	19/51 (37.25)	44/132 (33.3)
A/B	15/51 (29.4)	38/132 (28.8)
A/D	4/51 (7.85)	6/132 (4.55)
Todos O/O	5/51 (9.8)	6/132 (4.55)
B/B	4/51 (7.85)	4/132 (3.03)
B/D	1/51 (1.95)	2/132 (1.52)
Frecuencias alélicas		
A	0.7157	0.7879
O	0.2843	0.2121
B	0.2353	0.1818
D	0.049	0.0303
Promotor		
Y/Y	37/51 (72.55)	99/130 (76.2)
X/Y	13/51 (25.5)	27/130 (20.8)
X/X	1/51 (1.95)	4/130 (3.1)
Frecuencias alélicas		
X	0.1471	0.1346
Y	0.8529	0.8654
Haplotipos		
YA/YA	16/51 (31.35)	55/115 (47.8)
YA/YO	16/51 (31.35)	26/115 (22.6)
YO/YO	5/51 (9.8)	6/115 (5.22)
YA/XA	10/51 (19.6)	18/115 (15.7)
XA/XA	1/51 (1.95)	4/115 (3.5)
YO/XA	3/51 (5.9)	8/115 (7.0)

NOTA. La información proporcionada esta dada en (%), al menos que se indique lo contrario. Los alelos codificantes B y D fueron agrupados en conjunto y designados como alelo O.

Análisis de evolución clínica en relación con los genotipos de MBL2:

En los 51 pacientes analizados se encontraron 8 con insuficiencia de MBL según los genotipos hallados (XA/O o O/O) mientras que en los 43 pacientes restantes se halló suficiencia de MBL según los genotipos aislados (YA/YA, YA/XA, XA/XA ó YA/O). (Tabla 2)

Al analizar las características clínicas que presentaron el grupo de pacientes con insuficiencia de MBL respecto a los suficientes de MBL se observó: 2/8 vs 17/43 pacientes eran menores de 2 años de edad, y 4/8 vs. 13/43 eran inmunocomprometidos.

Respecto a la evolución clínica 1/8 vs 26/43 pacientes requirieron aporte de oxígeno suplementario (OR 0.093, CI 95% 0.01-0.82, $p=0.03$). Ningún paciente en el grupo de deficientes de MBL y 10 pacientes con suficiencia de MBL fueron admitidos en la unidad de cuidados intensivos. La mediana de días de internación fue de 4.5 días (RIC: 1-8 días) en los pacientes con déficit de MBL vs. 7 días (RIC: 5-15 días) en aquellos con suficiencia de MBL ($p=0.05$).

Se realizó un análisis de las características clínicas y el comportamiento de la MBL en el subgrupo de pacientes con edad menor de 2 años y aquellos inmunocomprometidos (Tabla 3). El total de pacientes analizados en este subgrupo fue de 33 niños y de ellos 6 pacientes tuvieron déficit de MBL y 27 pacientes tuvieron suficiencia de MBL.

Al comparar las características de evolución clínica en este subgrupo de pacientes se observó que sólo 1 paciente del grupo de insuficientes requirió aporte de oxígeno vs. 16 pacientes en el grupo de suficientes de MBL (OR 0.13, CI95% 0.014-1.34, $p=0.08$).

Ningún paciente del grupo de insuficientes y 6 pacientes del grupo de suficientes de MBL fueron admitidos en la unidad de cuidados intensivos. La mediana de días de internación fue menor en el grupo de insuficientes 2.5 días (RIC: 1-5 días) vs. 8 días (RIC: 5-15 días), $p=0.034$.

Tabla 2: Características generales de los 51 pacientes analizados según suficiencia o insuficiencia de MBL:

Variables	Insuficientes MBL N= 8 N (%)	Suficientes MBL N= 43 N (%)	OR (IC 95%) p
Edad (meses)	98 (29-187)	38 (9-97)	0.15 (*)
Sexo (meses)	4(50)	30 (70)	0.43 (0.09-2),0.28
Inmunocomprometidos	4 (50)	13 (30.2)	2 (0.49-10-6),0.28
Edad menor 24 meses	2 (25)	17 (39.5)	0.5(0.09-2.8),0.44
Oxígeno suplementario	1 (12.5)	26 (60.5)	0.9(0.01-0.8) 0.03
Días oxígeno suplementario, mediana (RIC)		4 (0-11)	
Ingreso a UCI	0	10 (23.26)	
ARM	0	10 (23.26)	
Días ARM (mediana, RIC)	0	6.5 (1.5-12.5)	
Días totales de internación(mediana, RIC)	4.5 (1-8)	7 (5-15)	0.05 (*)

Tabla 3: Características generales en el grupo de pacientes menores de 2 años y huéspedes inmunocomprometidos según insuficiencia o suficiencia de MBL:

Variables	Insuficientes MBL N= 6 N (%)	Suficientes MBL N= 27 N(%)	OR (IC 95%) p
Edad (meses)	104 (22-203)	11 (6-97)	0.10 (*)
Sexo (meses)	3 (50)	20 (74%)	0.35 (0.05-2.1)0.2
Inmunocomprometidos	4 (66)	13 (40)	
Oxígeno suplementario	1 (16.67)	16(59.2)	0.13(0.01-1.34)0.08
Días oxígeno,mediana (RIC)		4 (0-11)	
Ingreso a UCI	0	6	
Requerimientos ARM	0	6(22.2)	
Días totales de internación(mediana, RIC)	2.5 (1-7)	8 (5-15)	0.03 (*)

Tabla 4: Relación de los haplotipos de los pacientes con sus concentraciones plasmáticas de MBL

Haplotipos	MBL (ng/ml)	Observaciones
YA/YA	3266	7*
YB/XA	1351	
YA/XA	2862	1*
XA/XA	1846	
YA/YB	1405	
YA/YD	2605	
YB/YB	419	
YD/YD	0	
Y0/Y0	314	
XA/Y0	27	
YA/Y0	1705	
Total de haplotipos		
Insuficiente	759	
Suficiente	2928	

n*. Es el número de pacientes que tienen un dosaje de MBL >4000ng/ml pero que fueron considerados como 4000ng/ml para hacer los cálculos. Por lo cuál los resultados están siendo levemente subestimados

DISCUSIÓN:

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra los patógenos invasores y es particularmente importante para prevenir las infecciones bacterianas y virales que se presentan en la mucosa de la superficie

celular (14). Entre los componentes de la inmunidad innata, la lectina ligadora de manosa –MBL– es una colectina que juega un rol esencial en la respuesta inmune (13,15), promueve la eliminación de microorganismos patógenos al actuar como opsonina promoviendo la fagocitosis, o por eliminación directa activando el complemento a través de las serino-proteasas asociadas a MBL (MASP-1, -2 y -3) (16). Otras funciones de la MBL están relacionadas con modular la respuesta inflamatoria y promover la apoptosis, posiblemente a través de citoquinas de los monocitos (13,15-17,20).

Sin embargo estas propiedades varían entre los diferentes virus y subtipos virales (21-22 23)

Una deficiencia en la oligomerización normal de MBL estaría asociada con una mayor predisposición a contraer determinadas infecciones (21,22). Esto es particularmente importante cuando el sistema inmunológico adaptativo es inmaduro (como durante los primeros meses de vida) o está suprimido (ej. por inmunodeficiencias genéticas o adquiridas, luego del trasplante de órganos, o durante los tratamientos con quimioterapia) (24).

Los niveles de MBL circulantes en los 31 pacientes analizados coinciden con las variantes de genotipos hallados¹², salvo un paciente con una mutación en la región estructural alelo b y en el promotor alelo x que mostró niveles superiores a los esperados para ese genotipo > 4000, igualmente debe considerarse que esta describe la variabilidad (25)

La disminución de los niveles funcionales de MBL en circulación es producida por mutaciones en la región estructural y promotora del gen denominado *mb12*. En homocigotas como en heterocigotas compuestas los niveles de MBL son no detectables, mientras que en las heterocigotas el mayor efecto se asocia con la presencia de los alelos B y C¹².

La variabilidad en las concentraciones observada en la tabla 4 tiene relación con los polimorfismos genéticos, existe evidencia de que la concentración de MBL puede variar 1000 veces en individuos aparentemente sanos, de 10ng/ml a menos de 4ug/ml.(12)

En la población general se estima una prevalencia entre el 5-10% en el déficit de MBL. La prevalencia hallada de déficit de MBL como la distribución de genotipos de MBL2 fue similar a la que se halló en el grupo control de donantes de sangre

La inactivación viral se produciría por la inhibición de la hemaglutinación y de la infectividad.

Además, MBL actúa como opsonina, aumentando la activación de neutrófilos por Influenza A y protegiéndolos de la desactivación por el virus^{19,26}.

Las características de la población evaluada corresponde a la población que habitualmente se interna en el hospital Garrahan debido a que es un centro de alta complejidad que anualmente recibe un tercio de los pacientes con enfermedades oncohematológicas de todo el país.

En lactantes con deficiencia de MBL se observó mayor número de infecciones agudas del tracto respiratorio (27).

En pacientes oncológicos adultos bajo tratamiento quimioterápico se observó una asociación significativa entre bajos niveles de MBL e infecciones graves (28). Por otra parte en otro estudio realizado en niños oncológicos bajo tratamiento quimioterápico, se observó una mayor duración de los episodios de neutropenia febril (29). Sin embargo en nuestro estudio en el grupo de niños menores de 2 años y con patología inmunosupresora (oncohematológica o HIV) con suficiencia de MBL presentaron peor evolución de la infección por H1N1 2009 respecto a los insuficientes, con mayor duración de internación, de los días oxígeno suplementario y de la proporción de niños que requirieron ingreso a UCI.

Otros estudios realizados previos a la aparición del H1N1 2009, en población pediátrica con infecciones agudas del tracto respiratorio evidenciaron que la deficiencia de MBL es particularmente importante en el grupo de niños con mayor riesgo de infección con edades entre 6 y 18 meses. (28).

Un trabajo recientemente publicado no encontró diferencias en la evolución clínica de pacientes adultos deficientes o suficientes de MBL infectados con H1N1 2009 (30).

A la fecha no hay otros reportes publicados que evalúen la relación entre MBL y la evolución clínica en pacientes con infección por H1N1 en población pediátrica.

Un estudio reciente realizados in vitro en animales demostró un efecto pro inflamatorio deletéreo en aquellos con suficiencia de MBL e infección por H1N1 2009. Este fenómeno estaría relacionado con el hallazgo de que MBL contribuye a una mayor severidad en la respuesta en relación con el aumento en la producción de varias citoquinas pro inflamatorias como ser IL-1, IL-1 β , IL-6, TNF α e INF- α MBL fue hallado unido a pdm H1N1 in vitro, siendo el virus resistente a la actividad antiviral de la MBL (23). Es probable que este efecto sea de mayor importancia en aquellos pacientes con mayor riesgo de infecciones graves como lo constituyen los niños menores de 2 años y los huéspedes inmunocomprometidos.

El motivo de porque por qué la mayoría de los individuos deficientes en MBL no adquieren infecciones a repetición todavía no se conoce (25), aun-

que probablemente es debido a la redundancia del sistema del complemento o tal vez porque las variantes alélicas no son exclusivamente desventajosas tal como se observó respecto a la infección por H1N1 2009 en nuestra serie.

Una limitación importante del estudio es el no haber podido incluir a los pacientes fallecidos por H1N1 debido que la muestra de MBL fue realizada en forma atemporal respecto al momento de adquisición de la infección por H1N1.

Los resultados obtenidos sugieren que la suficiencia de MBL podría ser un factor de riesgo de severidad en niños con infección por H1N1 2009, particularmente en el grupo menor de 2 años y en huéspedes inmunocomprometidos. Probablemente, este resultado indica que la MBL podría estimular la respuesta inflamatoria generando un empeoramiento en la evolución de la infección viral.

La evolución clínica desfavorable de los pacientes considerados como suficientes para MBL respecto a los insuficientes podría explicarse a una sobre activación de la reacción inflamatoria a causa de los altos niveles de esta proteína. (23). Esto coincide con el hecho de que MBL tiene un rol importante en la regulación de la liberación de citoquinas pro inflamatorias por parte de los monocitos. (31, 32). Además hay que tener en cuenta que la mayoría de las manifestaciones de la gripe H1N1 son en parte causadas por la respuesta inflamatoria exacerbada.

ABSTRACT

Background: MBL is a pattern-recognition molecule, which functions as a first line of host defense. MBL deficiency linked to polymorphisms in MBL2 gene, is associated with increased susceptibility to respiratory virus infection. The aim of the study was to evaluate whether MBL variants play a role in the infection with H1N12009.

Methods: Demographic and clinical outcome data was collected. Frequencies of MBL2 allelic variants (0 =B, C or D; and X) were estimated in 51 H1N1 infected children and 132 blood donors. Univariate analysis was performed using STATA (8.0).

Results: MBL2 genotypic frequencies were similar among infected and control groups: A/A 53% vs 62%, A/O heterozygotes 37% vs 33%, and O/O homozygotes 10 vs 4.5%, respectively. Eight patients (15.7%) were classified as MBL insufficiency and 43 patients (84.3%) as MBL sufficiency. The clini-

cal characteristics between MBL insufficiencies vs. sufficiency were: 2 vs 17 patients (p.) were less than 24 months of age, and 4 vs. 13 p. were immunosuppressed, 1 vs. 26 patients needed supplemental oxygen (OR 0.093, CI 95% 0.01-0.82, $p=0.03$). No patients with MBL insufficiencies and 10 patients with MBL sufficiency required PICU admission and mechanical ventilation. The length of hospitalization were median of 4.5 days (IQR: 1-8 days) in the MBL insufficiency vs. 7 days (IQR: 5-15 days) in MBL sufficiency ($p=0.05$).

Among patients less than 24 months and immunosuppressed ($n= 33$ p.) the characteristics between MBL deficiency (6 p.) vs MBL sufficiencies (27 p.) were: need for supplemental oxygen (only 1 p.) vs 16 from MBL sufficiencies (OR 0.13, CI95% 0.014-1.34, $p=0.08$), length of hospitalization 2.5 days (1-5 days) vs 8 days (IQR: 5-15 days), $p=0.034$, PICU admission no patient in insufficient group and 6 patients from sufficient group.

Conclusion: These results suggest that MBL sufficiency may be a risk factor for severity of the disease in children infected with H1N1, particularly during childhood or in immunosuppressed patients. Probably, these results indicate that MBL could upregulate the inflammatory response worsening the evolution of the viral infection.

BIBLIOGRAFÍA

1. En Virology Fields, Volumen 2, Capítulo 48, pag: 1691-1740.
2. CDC. Interim guidance on antiviral recommendations for patients with novel influenza A (H1N1) virus infection and their close contacts. <http://www.cdc.gov/h1n1flu/recommendations> (accessed on May7, 2009)
3. Myers K. P., et al. Cases of swine influenza in humans: a review of the literatura. *Clin Infect Dis* 2007; 44:1084.
4. World Health Organization Pandemic(H1N1) 2009-update 112 [http:// www.int/csr/don/2010_08_06/en/index.html](http://www.int/csr/don/2010_08_06/en/index.html). Access 12 february 2011.
5. CDC Interim guidance for clinicians on the prevention and treatment of swine- origin influenza virus infection in Young children.
6. Padilla RP, Rosa-Zamoni D., Ponce de Leon S. et al Pneumonia and Respiratory failure from swine-origin Influenza A (H1N1) in México. *NEJM* 2009; 361:1-10.6 vieja- Ministerio de Salud de la Nación (Argentina).
7. World Health Organization, Human infection with new influenza A (H1N1) virus: clinical observations from Mexico and other affected countries, May 2009. *Weekly epidemiological record* 2009; 84: <http://www.who.int/wer/2009/wer8421.pdf>
8. Gentile A, Bakir J., Russ C., Ruvinsky S. Estudio de las enfermedades respiratorias por virus Influenza A H1N1 (pH1N1) en niños internados durante el año de la pandemia. Experiencia de 34 centros en la Argentina. *Arch Argent Pediatr*. 2011 Jun;109(3):198-203, 9)Paganini H., Parra A., Ruvinsky S. Clinical features and

- outcome of 2009 influenza A (H1N1) virus infections in children with malignant diseases: a case-control study *J Pediatr Hematol Oncol*. 2011 Jan;33(1):e5-8.
9. Sumiya M, et al. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 1991; 337:1569-70.
 10. Lipscombe RJ, et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1:709-15. Erratum in: *Hum Mol Genet* 1993; 2:342.
 11. Madsen HO, et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 1994; 40: 37-44.
 12. Holmskov U, et al. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today* 1994; 15:67-74.
 13. Levy JA. *Trends Immunol* 2001; 22:312-316
 14. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular Immunol* 2003; 40: 423-429.
 15. Petersen SV, et al. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol Immunol* 2001; 38:133-49.
 16. Sastry K, et al. Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense. *Curr Opin Immunol* 1993; 5:59-66. Review. Erratum in: *Curr Opin Immunol* 1993; 5:566.
 17. Thielens NM, et al. Interaction of C1q and mannan-binding lectin with viruses. *Immunobiology* 2002; 205:563-74
 18. Hartshorn KL, et al. Conglutinin acts as an opsonin for influenza A viruses. *J Immunol* 1993; 151: 6265-6273
 19. Thiel S, et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997; 386:506-10. *Nature* 1997; 386:506 –10
 20. Garred P, et al. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet* 1995; 346:941-3.
 21. Summerfield JA, et al. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ* 1997; 314:1229-32
 22. Mman To Ling, Wenwei Tu, Yan Han. Mannose- Binding Lectin Contributes to Deleterious Inflammatory Response in Pandemic H1N1 and Avian H9N2 Infection *The Journal of Infection Diseases* 2012; 205:44-53
 23. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:401-13.
 24. Heitzeneder S., Seidel M., Förster-Waldl E. et al. REVIEW Mannan-binding lectin deficiency — Good news, bad news, doesn't matter? *Clinical Immunology* (2012) 143, 22–38
 25. Hartshorn KL, et al. Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. *J Clin Invest*. 1993; 91:1414-20.
 26. Koch A. et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 2001; 285: 1316-1321
 27. Peterslund N et al. Association between deficiency of mannose- binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet* 2001; 358:637-8.
 28. Neth O et al Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. *Lancet* 2001; 358: 614-18.

29. Damon P. Eisen, Caroline Marshall, Melinda M. Dean et al. No association between mannose-binding lectin deficiency and H1N1 2009 infection observed during the first season of this novel pandemic influenza virus *Human Immunology* 72 (2011) 1091-1094)
30. Jack DL, Read RC, Tenner AJ, Frosch M, Turner MW, Klein NJ. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Infect Dis* 2001; 184:1152–62.
31. Nadesalingam J, Dodds AW, Reid KB, Palaniyar N. Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via the N-acetyl glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. *J Immunol* 2005; 175:1785–94.

PREVALENCIA DE ENFERMEDAD DE CHAGAS EN CANINOS EN ZONAS DE ALTA ENDEMICIDAD DE LA PROVINCIA DE SALTA

Binda J¹, Trova G², Alonso M³, Pereyra R⁴, Sánchez Negrette O^{4, 5}.

¹Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias Fac. Cs. Ag y Veterinarias UCASAL; ²Cátedra de Fisiología, Zootecnia, Fac. Cs. Ag y Veterinarias UCASAL;

³Cátedra de Histología y Patología. Fac. Cs. Ag y Veterinarias UCASAL; ⁴Cátedra de Inmunología. Fac. Cs. Ag y Veterinarias UCASAL; ⁵Cátedra de Química Biológica. Fac. Cs. Exactas UNSa

INTRODUCCIÓN

Desde hace cientos de años los perros conviven con el hombre, primero como animales de guarda y trabajo y actualmente como animales de compañía satisfaciendo demandas afectivas y emocionales de la sociedad humana. Esta convivencia tan estrecha permitió que ambas especies, humanos y caninos, padezcan algunas enfermedades comunes como las parasitosis.

Muchos de los parásitos que nos afectan resultan de la convivencia con animales domésticos, con el perro compartimos 65 enfermedades, con los bovinos 50, con ovejas y cabras 46, con el cerdo 42, con el caballo 35, con ratas y ratones 32 y con las aves 26. Hay muchos que afectan varias especies¹.

De todas las parasitosis posibles, nos enfocaremos en este trabajo en dos: la *Toxoplasmosis* y la *Trypanosomiasis americana*.

Toxoplasma gondii, es un protozoo ubicuo de los animales de sangre caliente, tiene afinidad selectiva por el tejido muscular y cerebral, con capacidad para persistir crónicamente desde una edad temprana².

El *T. gondii* presenta ciclos de multiplicación sexual o gametogónica en el intestino del gato y otros felinos salvajes³. Los felinos son los huéspedes naturales, mientras que los demás homeotermos son sus hospedantes intermediarios. Los felinos eliminan con las materias fecales ooquistes con capacidad de infectar manteniendo su virulencia por un año o más incluso en las condiciones más adversas y son resistentes a los desinfectantes químicos. Al contaminar pastos, verduras, animales de granja que están en contacto con la tierra, éstos se convierten en la

fuelle de infección de herbívoros y onmívoros. Por lo tanto, el contacto directo con el gato no implica riesgo, no así el material contaminado con sus deyecciones (4-6). Por lo tanto, la infección por *T. gondii* es adquirida principalmente por ingestión de agua y/o comida contaminada y mal cocida. Es bastante difícil determinar la prevalencia de *T. gondii* directamente en el ambiente. Sin embargo, Chao et al,⁷ considera una buena alternativa conocer la seroprevalencia de infección por *T. gondii* en perros. Por otra parte, estudios epidemiológicos muestran una prevalencia uniforme de *T. gondii* entre humanos y perros en una misma región, indicando que los perros podrían ser buenos centinelas de la exposición a *T. gondii* en humanos y en el medio ambiente⁸.

La provincia de Salta es endémica para la Enfermedad de Chagas. Esta enfermedad es una infección producida por un protozoo flagelado, el *Tripanosoma cruzi*. En el ciclo biológico del *T. cruzi* intervienen mamíferos y el *Triatoma infestans* (vinchuca), como principal vector en la Argentina. Los huéspedes mamíferos pueden ser el hombre y los animales domésticos (ciclo doméstico y peridoméstico) o silvestres como roedores y carnívoros (ciclo selvático) (9,10). Perros y gatos son epidemiológicamente importantes como fuentes de infección para insectos vectores, pero el perro 3 veces más que el gato (11, 12). En el medio rural, el perro constituye un nexo entre el domicilio, peridomicilio y el ambiente selvático debido principalmente a que no es un animal estático, pues presenta un movimiento constante entre el domicilio, y el peridomicilio, en muchas ocasiones puede dormir, cazar y alimentarse de carne de animales silvestres infectados, en las áreas selváticas pericomunitarias¹³. En éste contexto, los caninos tienen gran importancia por ser uno de los principales reservorios de la enfermedad, agravado por la estrecha convivencia entre esta especie animal y el hombre. Está demostrado que cuando los caninos infectados permanecen en áreas donde duermen sus dueños, la tasa de infección en insectos es significativamente mayor que cuando no lo hacen (14). La existencia de caninos seropositivos a *T. cruzi* indica la posibilidad de transmisión activa de la enfermedad de Chagas permitiendo monitorear la transmisión de la misma en el pasado más reciente¹⁵.

Debido a esto los objetivos de este proyecto fueron conocer la seroprevalencia de infección por *T. gondii* y *T. cruzi* en caninos en cuatro zonas rurales de la provincia de Salta.

METODOLOGÍA

Área de estudio

El estudio fue realizado en cuatro localidades de la provincia de Salta: a) La Unión perteneciente al Departamento Rivadavia (Banda Sur), Latitud 21° 11' 49" S, Longitud 62° 5257' 39" O, Altitud 210m snm; San Carlos Latitud 21° 5553' 73" S, longitud 65° 5643' 29" O Altitud 1604 m snm, Cafayate Latitud 26° 413' 16" S, longitud 65° 5843' 4" O Altitud 1620m snm, Embarcación Latitud 23° 13' 00", longitud 64° 06' 0" Altitud 273 m snm. Embarcación es la segunda ciudad del Departamento General José de San Martín.

Selección de individuos

Los canes fueron seleccionados de dos formas: a) por visitas domiciliarias en las localidades de La Unión y San Carlos; b) como parte de campañas de esterilización realizadas con apoyo de los municipios y de sociedades protectoras de animales, en las localidades de, Cafayate y Embarcación. Siempre se solicitó autorización de los propietarios o de sus cuidadores.

Datos epidemiológicos

Se completaron fichas de cada animal donde se registró: nombre del paciente, edad, sexo. Datos del propietario, conocimiento de enfermedades parasitarias, condiciones de las viviendas.

Toma de muestra de sangre

La toma de muestra se realizó por venopunción cefálica antibraquial extrayéndose entre 3 y 5 ml de sangre; se dejó retraer el coágulo, se separó el suero y se conservó a -20°C hasta su utilización en el procesamiento serológico.

Pruebas serológicas

Se utilizaron dos técnicas: HAI y ELISA adaptadas para la determinación de anticuerpos en perros.

Hemaglutinación Indirecta (HAI): se usó para la detección de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi* y contra el *Toxoplasma gondii*.

La Hemaglutinación Indirecta también llamada aglutinación reversa pasiva, se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos de producir aglutinación específica en presencia de glóbulos rojos (GR) sensibilizados con

los correspondientes antígenos (16). En el suero existen anticuerpos inespecíficos (heterófilos) que son capaces de aglutinar glóbulos rojos de distintas especies (17). Su presencia se investiga enfrentando el suero con GR no sensibilizados. Si se observa aglutinación inespecífica se procede a absorber los anticuerpos heterófilos incubando un volumen de suero con igual volumen de GR no sensibilizados 4 minutos a 37°C y posteriormente se centrifuga. Del sobrenadante se realiza HAI, considerando que éste suero está diluido al medio. Para todos los sueros, se realizan diluciones seriadas. Se consideran presumiblemente parasitados aquellos individuos cuyos sueros son reactivos en diluciones mayores o iguales a 1/16 (Chagatest HAI-Wiener Lab, Toxotest HAI-Wiener Lab).

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi*.

Previo a la realización de las muestras por ELISA, se procedió a estandarizar la técnica con diluciones seriadas de suero y de anti-inmunoglobulina *canis* conjugada con peroxidasa (Sigma-Aldrich) a fin de obtener las concentraciones apropiadas de trabajo. Para esto, se trabajó con pool de sueros caninos positivos y pool de sueros caninos controles negativos. Estos controles procedían de canes cuya infección fue confirmada por Hemocultivo y Reacción en Cadena de la Polimerasa y fueron cedidos por el Instituto de Patología Experimental (CONICET, Salta)

La reacción de ELISA se basa en la formación de inmunocomplejos entre antígenos inmovilizados en un soporte y los anticuerpos presentes en el suero. Se usaron 6 antígenos recombinantes. SAPA, 1, 2, 13, 30 y 36, (18). Las muestras de suero se diluyeron 1/30; luego de incubación y lavados se agregó anti-inmunoglobulina *canis* conjugada con peroxidasa en dilución 1:1000 (Sigma-Aldrich). Para revelar la reacción se agregó H₂O₂ como sustrato y Tetrametilbencidina como revelador se interrumpió la reacción por agregado de ácido sulfúrico (Wiener-Lab), y se leyó la absorbancia a 450 nm. Se realizó el cálculo del cutt-off, acorde a las especificaciones del kit Wiener Chagatest ELISA recombinante 3.0 (19,20).

ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania canina* (DEXX Laboratories):

En las muestras seropositivas a *T. cruzi* se realizó el test de ELISA (DEXX), con el objetivo de corroborar reacciones cruzadas. Se usaron como control sueros cedidos por el Instituto de Patología Experimental (IPE)-

CONICET, que provenían de perros diagnosticados con *L. visceral canina* por métodos parasitológicos, frotis, cultivo y serológicos (rk 39).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se usó test exacto de Fisher para evaluar la prevalencia de infección por *T. cruzi* y por *T. gondii* en las 4 regiones estudiadas (Epi-Info 6.0). Valores de $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

Consideraciones éticas: la toma de muestra y posterior análisis se realizaron con previa autorización de los dueños o protectores de los canes. La extracción de sangre, se realizó en condiciones asépticas y evitando el sufrimiento del animal.

RESULTADOS

La figura 1, indica las localidades de donde proceden los 209 perros analizados. Estas localidades son principales poblaciones rurales, con viviendas en su mayoría precarias como los muestra la figura 2. En los peridomicilios se encuentran corrales con cerdos, cabras y gallineros, como actividad pecuaria de subsistencia familiar.

Los resultados serológicos que indican la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* y anti-*T. gondii* se resumen en la tabla 1. Para considerar infectado por *T. cruzi* el animal debía tener resultados positivos para ambas pruebas: HAI y ELISA anti *T. cruzi*. Puede observarse que se encontraron perros infectados con *T. cruzi* sólo en la localidad de San Carlos, mientras que la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* fue hallada en todas las localidades. Consideramos importante resaltar las características epidemiológicas de los perros infectados con *T. cruzi* las que se describen en la Tabla 2.

CONCLUSIONES

Durante la infección aguda por *T. cruzi*, la parasitemia es detectable poco tiempo y su diagnóstico se realiza por métodos parasitológicos como el Hemocultivo o gota fresca, estos métodos resultan poco sensibles en

la fase crónica, mas prolongada de la infección. En el caso de la provincia de Salta, al ser una provincia endémica para *Leishmania spp* y ser éste un parásito relacionado con el *Trypanosoma cruzi* podríamos pensar que estas infecciones podrían dar reacciones cruzadas. Sin embargo todas las muestras de San Carlos seropositivas a *T. cruzi* fueron testeadas con ELISA anti-Leishmania canina y dieron seronegativas. Respecto a la infección por *T. gondii*, en la infección aguda se detecta en un corto lapso de tiempo, la Ig M, la cual es re-emplazada para toda la vida del animal por la Ig G. Los resultados de este estudio demuestran el apropiado uso de las técnicas de HAI y ELISA para determinar infecciones crónicas, por *T. cruzi* y por *T. gondii* en perros.

Este es el primer estudio que demuestra la infección de *T. cruzi* y de *T. gondii* en caninos en localidades de la provincia de Salta. En el presente estudio, se encontró una alta prevalencia de infección por *T. cruzi* en caninos en la localidad de San Carlos en perros no tan jóvenes, con un promedio de edad de 6 años. Además en las visitas domiciliarias no hemos encontrado vinchucas ni rastros de defecación de ellas en las paredes de las casas. Por otra parte, los pobladores manifestaron que sus viviendas habían sido rociadas hace unos 3 años atrás, pues habían tenido presencia de los vectores en ese Barrio. Al igual que Graiff y col,(21) consideramos que el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en los perros es una herramienta valiosa como screening de la enfermedad en un área geográfica determinada.

La alta seroprevalencia encontrada en perros en todas las localidades estudiadas debería ser un alerta de la presencia de *T. gondii* en el ambiente, siendo éste un potencial riesgo de infección en humanos. Se deberían tomarse precauciones a fin de asegurar que las comidas sean apropiadamente cocinadas, la leche pasteurizada y las verduras y manos bien lavadas durante la manipulación y preparación de las comidas.

Además sería conveniente tomar acciones a nivel del cuidado responsable de las mascotas, desparasitando, vacunando y cuidando convenientemente a los perros y gatos.

AGRADECIMIENTOS

Éste trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Católica de Salta y por un Subsidio a la Investigación otorgado por la Fundación Alberto J. Roemmers 2010-2012.

Se agradece especialmente a la MV. Mora María Celia, y al Dr. Marco Diego por su apoyo profesional y técnico brindado, del Instituto de Patología Experimental. CONICET. Facultad de Ciencias de la Salud UNSa.

REFERENCIAS

1. Editorial Larva migrans: perros, parásitos y hombres. Medicina (Buenos Aires) 2000; 60: 270-272
2. Alle Gelsomina, Cóceres Verónica, Zubiliaga Patricio, Antonelli Lucas, Angel Sergio, Echenique Gabriela. Empleo de proteínas Recombinantes de *Toxoplasma gondii* para diagnóstico de toxoplasmosis recientes y crónicas en perros del departamento Caseros Santa Fé, mediante la detección de Ig G. Revista Médica de Rosario 2011; (77) p 86. IX Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias Mar del Plata, Argentina, Sociedad Argentina de Protozoología.
3. Atías Antonio y Thiermann Erica. Cap. 31. Toxoplasmosis. En: Atías-Neghme. Parasitología Clínica. Tercera Edición. Mediterráneo 1991: 269-282
4. Hirt Juan Cap.42: Toxoplasmosis. En: Gorodner Jorge Osvaldo. Enfermedades Infecciosas. Editorial Universitaria de la Universidad Nacional del Nordeste. 1998¹: 361-364.
5. García Joao Luis, Navarro Italmar Teodorico, Ogawa Liza, Marangoni Marana elisabete Regina. Soroprevalencia do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criacoes domesticas, oriundas de propriedades rurais do Norte do Paraná, Brasil. (Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in back yard chicken (*Gallus gallus domesticus*) from rural properties in north Region of Paraná State, Brazil). Ciencia Rural, Santa María 2000(30) n°1: 123-127.
6. Dubey J.P., Venturini MC, Venturini L, Piscopo M, Graham DM, Dahl E, Sree-kumar C, Vianna MC and Lehmann T. Isolation and Genotyping of *Toxoplasma gondii* from Free-Ranging chickens from Argentina. Journal of Parasitology 2000. 89⁵. 1063-1064.
7. Chao Yan, Lin lin Fu, Cai-Ling Yue, Ren-Xian Tang, Yi-Sheng Liu, Liang Lv et al. Stray dogs as indicators of toxoplasma gondii distributed in the environment: the first report cros san urban-rural gradient in China Parasites&Vectors 2012 5: 5: 1-6 <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/5>
8. Tonter AM, Hecherath AR and Weiss LM. *Toxoplasma gondii* from animal to human Int J Parasite 2000 (30): 1217-58
9. Atías Antonio, Apt Werner. Cap 30: Enfermedad de Chagas En: Atías-Neghme. Parasitología Clínica. Tercera Edición. Mediterráneo. 1991. Pag: 255-268.
10. Wisnivesky C, Colli NJ, Schweigmann A, Alberti A, Pietrovsky SM, Conti O, Montoya S, Riarte A and Rivas C. Sylvatic American tripanosomiasis in Argentina. *Trypanosoma cruzi* infection in mammals from the Chaco forest in Santiago del Estero. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1992 (86): 38-41.
11. Gürtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, Cohen JE. Domes-

- tic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 2007 Jan 134¹: 69-82
12. Minter Donald. Efectos de la presencia de animales domésticos en viviendas infestadas sobre la transmisión de la enfermedad de Chagas al hombre. *Bol of Sanit Panam* 1978. 84⁴: 332-343.
 13. Rojas ME, Vásquez P, Villarreal MF, Velandia C, Vergara L, Morán-Borges YH, Ontiveros J, Valderon MY, Chiurillo-Siervo MA, Rodríguez-Bonfante C, Aldana E, Concepción JL, Bonfante-Cabarcas RA. Estudio seroepidemiológico y entomológico sobre la enfermedad de Chagas en área infestada por *Triatoma maculata* (Erichson 1848) en el centro-occidente de Venezuela. *Cad Saúde Pública, Río de Janeiro*, 2008. 24¹⁰:2323-2333.
 14. Gurtler RE, Cecere MC, Petersen RM, Rabel DN, Schweigmann NJ. Chagas disease in north-west Argentina. Association between *Trypanosoma cruzi* parasitaemia in dogs and cats and infection rates in domestic *Triatoma infestans* *Trans R Soc Med Hyg* 1993: (87) 12-15.
 15. - Reyes L, Siesky E, Cerdan C, Chinchilla M y Guerrero O. Presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en perros en Costa Rica *Parasitol Latinoam* 2002. 57: 66-68 FLAP.
 16. Boyden SV. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein serum. *J. Exp. Med.* 1951. 93: 107-120.
 17. Konishi E. Naturally occurring antibodies that react with Protozoan Parasites. *Parasitology Today*. 1993 p: 361-364
 18. Ibañez CF, Alfranchino JL, Macina RA, Reyes MB, Leguizamón S, Camargo ME, Aslund L, Pettersson U and Frasch Alberto C. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol* 1988. 30: 27-34.
 19. Felcaro MV, Toplikar E, Medrano G, Ríos M, Vila MS, García M, Ghacón G, Capriotti G y Toruella M. Evaluación de un nuevo ELISA recombinante para la detección de anticuerpos anti-*t. cruzi* 67º Congreso Argentino de Bioquímica, Buenos Aires. 2006 y XI Congreso Argentino de Medicina Transfusional y Simposio Internacional de Sangre de Cordon Umbilical. Buenos Aires, 2007
 20. Sánchez Negrette O, Sánchez Váldez FJ, Lacunza CD, García Bustos MF, Mora MC, Uncos AD, Basombrío MA. Serological Evaluation of Specific Antibody Levels in Patients Treated for chronic chagas' disease. *Clinical and Vaccine Immunology* 2008. (15): 297-302.
 21. Graiff DS, Zurbriggen GF, Aleu G, Sequeira G, Faya M, Marini V, Mucha C, Widenhorn N, Moretti E, Basso B. Seropositividad para *Trypanosoma cruzi* en caninos de la localidad de La Para (Córdoba, Argentina). *Comunicación corta. InVet* 2009, 11¹: 11-14 ISSN (papel): 11514-6634, ISSN (on line) 1668-3498.

Gráfico 1.



Grafico 2.



Tabla 1. Prevalencia de anticuerpos contra *T. gondii* y *T. cruzi* en sueros de perros procedentes de las diferentes localidades.

Departamento	Localidad	Ac anti <i>T. gondii</i>	Ac anti <i>T. gondii</i>	Ac anti <i>T. cruzi</i>	Ac anti <i>T. cruzi</i>
		Positividad*	%	Positividad*	%
Rivadavia	La Unión	4/22	18.18	0/22	0
San Carlos	San Carlos	8/39	20.5	11/39	28.20
Cafayate	Cafayate	11/84	13.09	0/84	0
Gral. San Martín	Embarcación	15/64	23.43	0/64	0
Total		38/209		11/209	

*Número de animales positivos/número total de animales estudiados

Tabla 2. Características epidemiológicas de los perros infectados con *T. cruzi* de la localidad de San Carlos

Procedencia	sexo	Edad años
San Carlos (SC)	Hembra	4.0
San Carlos	Macho	0.1
San Carlos	Hembra	1.5
San Carlos	Macho	6
San Carlos	Macho	8
San Carlos	Hembra	5
San Carlos	Macho	11
San Carlos	Macho	10
San Carlos	Macho	11
Animaná (SC)	Hembra	7
Animaná (SC)	Macho	8

EVALUACIÓN DE CITOQUINAS, ENZIMAS Y ANTICUERPOS COMO BIOMARCADORES ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PLEURESÍAS INFECCIOSAS Y MALIGNAS.

Dr. Schierloh L. Pablo^{1#}, Dra. Rosa M. Musella², Sta. Elizabeth Colman³,
Dra. Graciela C. de Casado^{2,4}.

¹Instituto de Medicina Experimental-IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. ²Servicio de Tisioneumonología, Hospital Muñiz.

³Facultad de Biología, Universidad CAECE, Buenos Aires. ³Instituto "Prof. Dr. R.F. Vaccarezza"-UBA, CABA, Argentina.

lp_shier@hotmail.com

INTRODUCCION

La pleura es una membrana serosa que rodea los pulmones y recubre internamente la caja torácica definiendo una cavidad conocida como espacio pleural. Este espacio se encuentra bañado por una fina película de fluido cuyo volumen, composición y renovación se encuentran fisiológicamente controlados por el mesotelio pleural y, en menor medida por drenaje linfático. En condiciones fisiológicas, la función del líquido pleural (LP) es la de acoplamiento mecánico y lubricación entre la pared torácica y el pulmón durante los movimientos asociados a la respiración (Zocchi 2002).

En ciertas condiciones patológicas se produce un desbalance entre las fuerzas que controlan el volumen del LP dando lugar a un derrame o efusión pleural. Básicamente, estos derrames pueden clasificarse como trasudados o exudados dependiendo de su contenido en células y proteínas. En los procesos inflamatorios de la pleura (pleuritis) pueden desarrollarse exudados que contienen leucocitos que arriban al foco, como así también descamaciones del mesotelio y/o células de origen maligno (Mutsaers 2002). Las poblaciones celulares presentes como así también sus productos de secreción varían en función del origen etiológico y del tiempo de evolución de la pleuritis (Antony & Mohammed 1999).

Teniendo en cuenta que la composición del LP refleja el microambiente inflamatorio propio de la enfermedad en cuestión, nos preguntamos si algunas de estas características distintivas pueden ser explotadas para el diagnóstico específico.

A lo largo del presente trabajo desarrollamos y testeamos la aplicabilidad de una serie de técnicas de medición de biomarcadores a fin de identificar posibles candidatos útiles para el diagnóstico diferencial de la pleuresía tuberculosa. Encontramos que el dosaje de anticuerpos específicos contra estructuras de la pared celular, péptidos secretados, lípidos y glicoconjugados de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) no revela aumentos significativos entre el LP y la sangre periférica (SP) de pacientes con TB. En consonancia con este resultado, tampoco verificamos aumentos significativos en la actividad peroxidasa del LP de pacientes con TB. Todo esto sugiere que ni los Anticuerpos específicos ni la actividad enzimática estudiada presentan las características deseables para un biomarcador diferencial.

En estudios previos (Schierloh et al. 2005, 2007, 2009, 2011), pusimos en consideración si el perfil inmunológico conocido como “TH1”, que es característico de la pleuresía tuberculosa, podría aportar componentes celulares y solubles de significativo valor diagnóstico. Entre los compuestos solubles evocador por una respuesta TH1 nos inclinamos por analizar la molécula proinflamatoria interferón gamma (IFN- γ), dado que ha sido comprobado fehacientemente su rol protector en pacientes con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar (Kaufman 2005). Interesantemente encontramos que la producción endógena de esta molécula se encuentra fuertemente compartimentalizada en pacientes TB dado que los LP presentan un gran aumento respecto de los niveles séricos. En función de este resultado determinamos luego la actividad de las células productoras de esta citoquina en el LP. Para ello estimulamos por 24h células mononucleares pleurales (LPMC) con *Mtb* y medimos por citometría de flujo y por ELISA la producción *ex vivo* de IFN- γ . Por el método de citometría de flujo pudimos identificar a los linfocitos T CD4⁺ y a las células NK CD56^{brigh} como las principales fuentes de dicha citoquina. Este hallazgo permitió aplicar un análisis discriminado que indica que determinación del % células NK IFN- γ ⁺ presenta la mayor sensibilidad y especificidad para diferenciar entre derrames pleurales TB y de otro origen.

OBJETIVOS:

Puesta a punto, validación y análisis de factibilidad de nuevos inmunoensayos, bioensayos y determinaciones enzimáticas orientadas a discriminar etiológicamente exudados pleurales de origen maligno e infeccioso, con especial énfasis en el diagnóstico diferencial de la pleuresía tuberculosa.

MATERIALES Y METODOS:

Población en estudio: Los pacientes fueron reclutados en el Pabellón de Tisioneumonología del Hospital Muñiz. Los pacientes incluidos en el estudio fueron HIV negativos con derrames pleurales a causa falla cardíaca congestiva (trasudado, n=1), cancer de origen no mesotelial (exudados, n=2), neumonía de la comunidad (exudados, n=6) y tuberculosis (exudado, n=35), quienes firmaron un consentimiento informado previo a la obtención de la muestra. El líquido pleural (LP) fue obtenido por el método de toracocentesis (Schierloh et al. 2005). El presente estudio ha sido avalado por los Comités de Ética de la Academia Nacional de Medicina y del Hospital Muñiz. Cabe aclarar que por razones de disponibilidad de muestras, no todos los ensayos pudieron aplicarse a todos los participantes. Para evitar el sesgo estadístico derivado de este hecho, para cada tipo de ensayo se empleo el método de muestro secuencial.

Muestras a evaluar (SP y LP): Sueros (SP) y líquidos pleurales libres de células (LP) sin tratar y/o deplementados por calor (30min. a 60°C) fueron obtenidos por centrifugación (5min; 500g; T° ambiente) y almacenados en freezer -20°C hasta el momento de ser analizados por medio de las metodologías que se detallan más adelante, previa dilución en PBS estéril o buffer de reacción.

Células Mononucleares Pleurales (LPMC): Las células mononucleares presentes en líquidos pleurales (PFMC) fueron obtenidas por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque. Luego de 2 lavados en solución fisiológica, fueron contadas y resuspendidas en medio completo (RPMI 10% suero fetal bovino) a una densidad de $1-2 \times 10^6/\text{ml}$ e incubadas por 18hs a 37°C. Para la detección de las citoquinas intracitoplasmáticas (ver más adelante) se agregó Brefeldina A (5µg/ml) durante las últimas 5h de cultivo a fin de inhibir la secreción vía golgi. Para la medición de secreción de citoquinas se colectaron los medios condicionados (CM) los cuales se almacenaron sin diluir en freezer a -70°C hasta ser ensayados por medio de las metodologías que se detallan a continuación.

ELISAS:

Detección de Anticuerpos (Ab) anti-Antígenos (Ag) solubilizados: Para la determinación semicuantitativa de Ab específicos dirigidos contra

Ag solubles, 1-10µg/well de Ag fueron dispensados en placas de 96 pozos de alto *binding* e incubados toda la noche (ON) a 4°C en diferentes soluciones de pegado (*coating Buffer*) que fueron seleccionadas en base a datos bibliográficos y nuestra experiencia. Luego de 3-7 lavados con soluciones de lavado (*washing buffer*) adecuadas según el Ag, se incubaron con diluciones seriadas de SP o LP por 3h a T° amb. Seguidamente, luego de 3-7 lavados, fueron incubadas con una dilución 1/1500 de Ab anti-hlgG/A/M conjugado con HRP. Por último, luego de 3-7 lavados más, se desarrolló la reacción colorimétrica empleando TMB como sustrato. Las mediciones cinéticas de DO (densidad óptica) se efectuaron a 652nm de longitud de onda de lectura mientras que las de punto final se efectuaron a 450nm (referencia 570nm) luego de detener la reacción con H₂SO₄ 2N. Los Ag solubles testeados en el presente estudio fueron: PPD (*purified protein derivative*), ManLAM (*mannosylated lipoarabinomannan*), TLip (*total lipids extract*), P19KD (*19kD lipoprotein*), HSP10(*10kDa heat shock protein*) y poli Manano.

Detección de Anticuerpos anti-Pared celular (Cell based ELISA):

Para la determinación semicuantitativa de Ab específicos dirigidos contra estructuras de pared celular, 1-10x10⁶ bacterias/well fueron dispensadas en placas de 96 pozos e incubadas con diluciones seriadas de SP, LP o CM. Luego de 3-7 lavados por centrifugación 5 a 13000rpm, serán incubadas con una dilución 1/1500 de Ab anti-hlgG/A/M conjugado con HRP. Por último, luego de 3-7 lavados más, se desarrollará la reacción colorimétrica empleando TMB como sustrato.

Detección de Citoquinas: Para la determinación cuantitativa de IFN-γ endógeno presente en SP y LP o secretado en los CM se empleó un Kit comercial siguiendo las recomendaciones del fabricante (*eBioscience*). Las muestras de SP y LP fueron diluidas entre 2-10 veces y los CM entre 5-50 veces.

Citometría de flujo y microscopía de inmunofluorescencia:

Detección de Anticuerpos anti-Pared celular isotipo-específicos:

Mycobacterium bovis BCG, *M. smegmatis* y diferentes aislados clínicos de *M.tuberculosis* (Mtb) inactivados por radiación gamma fueron incubados 20min a T° ambiente en presencia de una dilución (1/1000) de SP o LP. Luego de 2 lavados en PBS, las bacterias opsonizadas se incubarán en presencia

de anticuerpos secundarios conjugados con FITC dirigidos contra IgA, IgM, IgG, IgE o Igk humana y se analizarán por citometría de flujo y/o microscopía de inmunofluorescencia.

Detección de citoquinas intracitoplasmáticas: LPMC previamente incubadas en presencia de Mtb fueron marcadas superficialmente con mAb anti-CD3, CD4, y/o CD56 por 20min a 4°C. Luego, fueron lavadas, fijadas, permeabilizadas y finalmente incubadas 20min a T° ambiente con anticuerpos anti-IFN- γ . Por último, la expresión intracelular de dicha citoquina fué determinada por citometría de flujo sobre diferentes poblaciones linfocitarias.

Determinación de Actividad de Enzima Peroxidasa: A un volumen de dilución de muestra SP o LP a T°ambiente se le adiciona igual volumen de solución de sustrato TMB (Ver tabla 3). La reacción se deja proceder en oscuridad por 25minutos. Transcurrido este período, se detiene la reacción con 1 volumen de H₂SO₄ 2N se mide la DO a 450nm restando 570nm.

Análisis y procesamiento de datos:

Cálculos y transformaciones: Para el cálculo de Afinidades relativas de Ab se realizó un análisis de regresión no lineal con el software Prisma® (GraphPad Software Inc). Para los cálculos y transformación de datos crudos y para la representación de valores en escalas de colores (heatmap) se empleó Excel 2007 (Microsoft Office).

Inferencia estadística: Para efectuar inferencias estadísticas entre muestras pareadas (LP vs SP) de un mismo donante se aplicó la prueba de Wilcoxon (no paramétrica). Para comparaciones entre más de 2 tratamientos sobre una misma muestra se aplicó ANOVA de un factor para mediciones repetidas. Para comparaciones entre muestras provenientes de distintos individuos (TB vs no TB) aplicamos la prueba Mann-Whitney (no pareada, no paramétrica). Para el análisis de sensibilidad/especificidad se aplicó la curva ROC (Receiver operator characteristic curve). Para la representación gráfica de los resultados y efectuar los citados test estadísticos empleamos el software Prisma® (GraphPad Software Inc) considerando valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos.

Análisis de Clusters: Para el análisis de clusters se aplicó el método de k-means implementado en el programa SPSS 15.0 (SPSS inc.).

Imágenes: Photoshop (Adobe) fue empleado para el procesamiento de imágenes y la organización de las figuras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

1. Anticuerpos específicos dirigidos contra Ag solubilizados de Mtb

1.1. Puesta a punto

1.1.1. ELISA indirecto anti-PPD (*Purified Protein derivative*): El Ag conocido como PPD es una preparación proteica purificada preparada a partir del medio condicionado de cultivo de Mtb. Normalmente se emplea para el ensayo diagnóstico de tuberculosis latente conocido como intradermoreacción o prueba de Mantoux. Para el dosage de anticuerpos séricos o pleurales que reconozcan epítopes presentes en las proteínas PPD, desarrollamos un ensayo de ELISA indirecto donde se ajustaron los siguientes parámetros: Tipo de placa, concentración de Antígeno; composición y pH de los buffer de pegado, bloqueo y dilución; dilución de muestra y rango de sensibilidad; concentración y especificidad del Ab conjugado y sistema de revelado enzimático (Figura 1A y Tabla 1). El tipo de placa que seleccionamos en este paso fue la de media área, que debido a sus características también resultó adecuada para los demás Ag y permitió además reducir los costos de cada ensayo por emplear la mitad de volumen que las placas comunes.

1.1.2. ELISA indirecto anti-TLip (*Total lipid extract*): El Ag TLip es un extracto orgánico (cloroformo/metanol 2:1 a 55°C durante 18hs) de células de Mtb enteras. Para el dosage de anticuerpos anti-TLip desarrollamos un ensayo de ELISA indirecto donde se ajustaron los mismos parámetros mencionados arriba. Cabe aclarar que la naturaleza hidrofóbica de este antígeno impidió el empleo de soluciones de pegado acuosas ni soluciones de lavado que contengan detergentes (Tabla 1). El extracto seco de TLip fue solubilizado en cloroformo a una concentración de 1mg/ml y esta solución fue diluida en la solución de pegando (Etanol 100%) e inmediatamente plaquada para evitar la formación de fases de diferente polaridad. A diferencia de los ensayos de ELISA con

soluciones de pegado acuosas, en este caso se dejó la placa destapada y a temperatura ambiente para favorecer la evaporación del líquido y la adsorción en seco del Ag a la placa.

1.1.3. ELISA indirecto anti-ManLAM (Mannosilated lipoarabinomannan): El glicolípido ManLAM es el mayor lipoconjugado constituyente de las membranas plasmáticas de Mtb. Su purificación requiere de una serie de pasos preparativos de extracción orgánica y partición en fase acuosa, dada la naturaleza anfipática de la molécula. Los resultados de la puesta a punto del ELISA se resumen en Tabla 1. Para este Ag también omitimos el empleo de detergente en los lavados para evitar la desorción a la placa.

1.1.4. ELISA indirecto anti-Proteína de 10KD (Proteína de Choque térmico derivada de Mtb): La proteína de choque térmico de 10KD (HSP10) es un conocido Ag de Mtb cuya inmunogenicidad ha sido vinculada con su abundancia relativa en la bacteria. Para el dosaje de anticuerpos séricos o pleurales que reconozcan epítopes presentes en la proteína de 10KD, las condiciones óptimas de ensayo fueron casi idénticas que para PPD, con la excepción de que las muestras fueron plaquedadas a mayor concentración (Tabla1).

1.1.5. ELISA indirecto anti-Proteína de 19KD (Lipoproteína de 19KD derivada de Mtb): La lipoproteína de 19KD es un conocido factor de virulencia presente en Mtb cuya porción lipídica ha sido vinculada al reconocimiento innato mediado por TLR2. El antígeno que empleamos aquí es una proteína recombinante expresada en E.coli por lo que carece de esta modificación postraducciona. Al igual que para HSP10, las condiciones de ensayo fueron las del PPD con diferencias de la dilución de la muestra (Tabla 1).

1.1.6. ELISA indirecto anti-Manano (Polímero de manosas): La pared de Mtb está fundamentalmente constituida por glicoconjugados ricos en arabinosa, galactosa y manosa. Teniendo esto en mente, diseñamos un ELISA empleando un polisacárido de manosas denominado Manano el cual potencialmente permite detectar la presencia de anticuerpos reactivos contra la pared de Mtb en muestras de pacientes con TB. Dicho antígeno se obtiene de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de cerveza). Encontramos que el Ag se adaptó perfectamente a nuestras condiciones normales de ensayo, con la excepción de que requirió una mayor cantidad de Ag y una mayor dilución de muestra para la detección óptima de la señal específica (Máxima relación OD total/OD blanco).

Tabla 1: En tabla 1 se resumen valores de los parámetros optimizados para los ensayos de ELISA indirecto obtenidos en pruebas de puesta a punto.

Antígeno	Concen-tración de pegado	Buffer de Pegado	Buffer de Lavado	Solución de bloqueo y diluyente	Dilución de Muestra	Sistema de detec-ción (Proveedor)
TLip ¹	10 µg/ml	EtOH 100%	PBS 1% BSA pH=7.2	PBS 0,5% BSA 1% HSA pH=7.2	1/1000	Anti-IgG/M/A humana conju-gado con HRP (Sigma)
ManLAM ²	1µg/ml	PBS pH=8.4			1/1000	
PPD ³		Buffer CO ³ pH=9.5	1/1000			
HSP10 ⁴			1/800			
P19KD ⁵			1/500			
Manano ⁶	5µg/ml				1/1500	

^{1 y 2} El extracto lipídico total y el ManLAM derivados de la cepa H37Rv fueron gentilmente provistos por el Dr Belisle (Colorado State University, USA).
³ La PPD derivada de aislados clínicos europeos fue provista por el Statens Serum Institut (Copenhagen, Denmark)
^{4 y 5} Las proteínas recombinantes clonadas de la cepa H37Rv, producidas en *E.coli* y purificadas por afinidad fueron provistas por la organización mundial de la salud (OMS).
⁶ El manano fue comprado a Sigma-Aldrich (C.A.B.A, Argentina).

1.2. Prueba de Hipótesis

Dado que los datos bibliográficos presentan contradicciones respecto del valor diagnóstico de los anticuerpos presentes en el LP de diferentes etiologías, decidimos comparar los valores relativos de los títulos frente a los citados Ag micobacterianos en el LP y la SP de pacientes con TB. Analizados individualmente, ninguno de los Ag aquí estudiados presentó niveles significativamente incrementados de inmuno-reactividad en el LP. Este hecho, sumado a la gran variabilidad observada entre los participantes afectó negativamente las chances de que estos ensayos puedan ser considerados per se buenos predictores de enfermedad (Figura 1A). Por otra parte, realizamos un análisis grupal del patrón de inmuno-reactividad presente en la SP y el LP pleural de cada paciente con el fin de evidenciar si existía alguna asociación con valor diagnostico entre los Ag (Análisis Multivariado). Mediante estos métodos pudimos clasificar a la población de pacientes en 4 clusters (Figura 1B). Los integrantes de cada cluster comparten un patrón de distribución y

especificidad de la inmuno-reactividad que los diferencia significativamente de los pacientes que integran los demás clusters. Si bien esta caracterización podría tener cierto interés académico, el valor práctico de estos patrones en el diagnóstico de la pleuresía es despreciable con respecto al esfuerzo analítico-experimental que requiere su realización. Finalmente, testeamos si el análisis de la afinidad relativa de los Ab presentes en LP y SP podría revelar características diferenciales con algún potencial diagnóstico. Lamentablemente no hallamos evidencias que justifiquen esta hipótesis (Figura 1C.). Tomando todo esto en consideración, concluimos que un diagnóstico serológico del LP basado en Ab específicos no presentó en ninguno de los 6 Ag micobacterianos aquí estudiados, las características de factibilidad requeridas para estudios posteriores.

2. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA PARED CELULAR DE MTB.

2.1. ELISA basado en Células, puesta a punto.

El LP de pacientes con tuberculosis (TB) es un exudado rico en moléculas secretadas por células del sistema inmune que son específicamente reclutadas al foco inflamatorio. En este sentido, nosotros hipotetizamos que anticuerpos específicos dirigidos contra la bacteria podrían encontrarse aumentados en el LP de pacientes TB, constituyendo una herramienta para el diagnóstico diferencial del derrame pleural por TB.

A fin de medir anticuerpos que reconozcan estructuras presentes en la pared celular de Mtb, desarrollamos un método de ELISA donde empleamos como Ag la bacteria intacta en lugar de emplear un Ag soluble adsorbido a un soporte sólido como es común observar. Este método garantiza que sólo los anticuerpos capaces de reconocer epítopes accesibles en la superficie del patógeno serán detectables. Durante la fase de puesta a punto, optimizamos distintos parámetros experimentales como dilución de la muestra, concentración de Ag particulado, tiempos de incubación, etc. También comparamos el desempeño de 2 cepas de Mtb para ser empleadas en este ensayo. Una es un aislamiento de un brote de alta virulencia en USA (Valway et al. 1998) denominada CDC1551. La otra cepa es un aislamiento local perteneciente al linaje latino-americano (LAM) conocida como 6006. El desempeño como Ag particulado en suspensión de ésta última fue muy superior (Figura 2) por lo que fué seleccionada para ser empleada en los sucesivos ensayos de dosaje de Anticuerpos anti-pared celular.

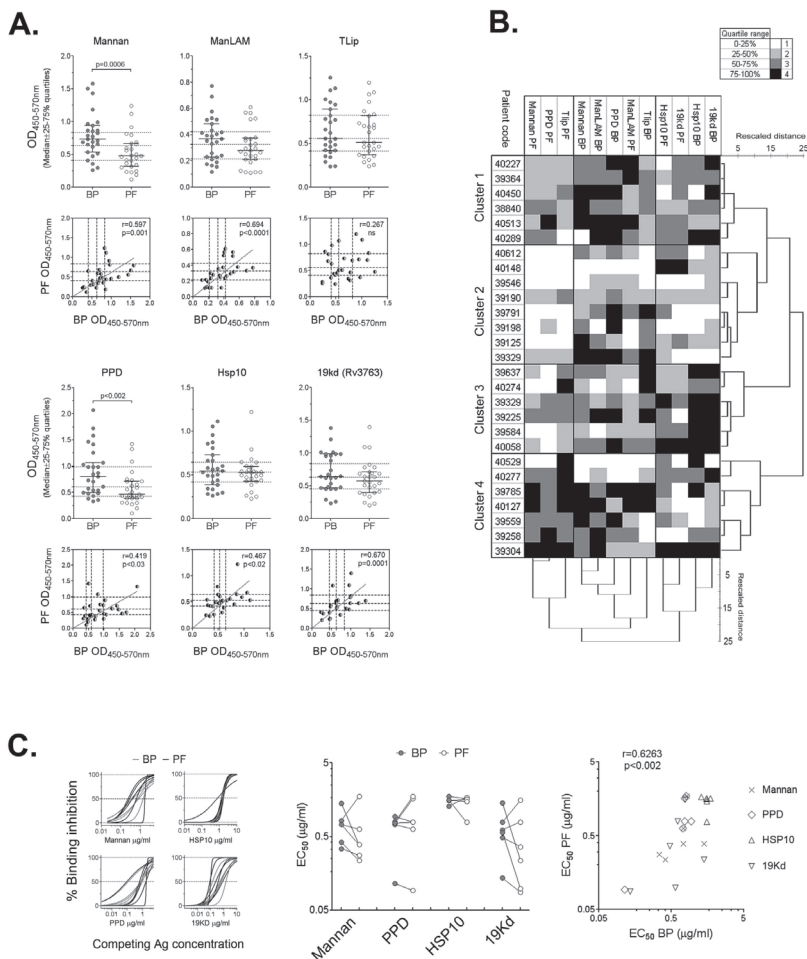


Figura 1. Ensayos de ELISA indirectos para la detección en SP y LP de Anticuerpos específicos dirigidos contra moléculas abundantemente expresadas en *M. tuberculosis*. A. muestra los resultados de los 6 ensayos diferentes donde se evaluaron 2 muestras pareadas (PF, líquido pleural y PB, plasma sanguíneo) de 27 pacientes. Los datos son presentados en función del tipo de muestra y correlacionados para cada paciente. B. Análisis multivariado (clasificación de K-means basada en un análisis previo de componentes principales) del conjunto de datos del panel A.C. Análisis de afinidad relativa de 6 pacientes representativos. Los datos son presentados en función del tipo de muestra y el tipo de Ag (Izquierda) y correlacionados para cada paciente (Derecha).

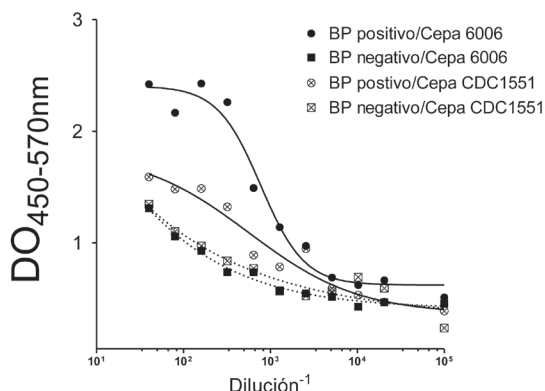


Figura 2. Puesta a punto de un ensayo de ELISA-basado en células para el dosaje de Anticuerpos anti-pared celular de *Mtb* en pacientes con tuberculosis pleural. Los resultados muestran el desempeño de 2 cepas de *Mtb* utilizadas como antígeno particulado en suspensión. Nótese que la cepa del linaje LAM derivada de un aislamiento local (Cepa 6006) presenta un mejor desempeño que la cepa obtenida de un brote en USA durante la década de los'90 (CDC1551, Valway et al. 1998; N Engl J Med 338, 633-639.).

2.1.1 Prueba de Hipótesis

En estudios sucesivos comparamos la inmureactividad de 25 muestras pareadas de SP y LP contra la cepa 6006 empleando el ensayo descrito en la sección 2.1. No hallamos diferencias significativas entre ambos tipos de muestra, a la vez que evidenciamos una alta variabilidad entre pacientes (Datos no presentados). Esto sugiere que los Ab totales dirigidos contra la pared de *Mtb* tampoco presentan compartimentalización en el sitio lesional al igual que los Ab contra moléculas solubles (sección 1.1).

2.2. Citometría de Flujo, puesta a punto.

Continuado con la tarea de caracterizar Ab que reconozcan estructuras presentes en la pared celular de *Mtb*, desarrollamos una serie métodos basados inmuno-fluorescencia indirecta mediante citometría de flujo. Por medio del uso de anticuerpos secundarios fluorescentes de especificidad definida, estos métodos permiten no solo estimar la cantidad relativa de anticuerpos anti-pared de *Mtb* presentes en una dada muestra, sino también discriminar

el isotipo de los mismos. Durante la fase de puesta a punto, optimizamos distintos parámetros experimentales como dilución de la muestra, tiempos de incubación, concentración de bacteria, etc. También se analizó si existe una inmunoreactividad diferencial dependiendo del background genético del patógeno. Para esto enfrentamos diferentes aislados locales de Mtb con un pool de sueros de alto título contra Mtb de la cepa 6006 determinado con el método descrito en la sección 2.1.

Nuestros resultados mostraron una mayor immuno-reactividad de los anticuerpos de isotipo IgG e IgM pero no se evidenciaron patrones diferenciales entre muestras de suero o LP. Por otro lado, pudimos evidenciar una alta variabilidad entre la inmunoreactividad de las distintas cepas sin que se observe un correlato evidente con su background genético (Figura 3).

2.2.1 Prueba de Hipótesis

Finalmente, dado que presentaron un comportamiento más estable en los ensayos de puesta a punto, seleccionamos la cepa 6006 y los Ag de tipo IgG para llevar a cabo un estudio de factibilidad con 20 muestras pareadas de SP y LP pleural. Encontramos el los niveles de Ab IgG levemente mayores ($p < 0.05$) en SP que en LP, lo cual resulta de cierto interés académico pero de escaso valor diagnóstico de acuerdo a nuestros propósitos anunciados.

3. ACTIVIDAD PEROXIDASA

3.1. Puesta a punto:

Considerando que nuestros sobre Ab como biomarcadores no arrojaron resultados plausibles para el diagnóstico diferencial, nos planteamos estudiar actividades enzimáticas asociadas a leucocitos inflamatorios. Para esto, primero llevamos a cabo la puesta a punto de un ensayo espectrofotométrico para medir la actividad peroxidasa, una enzima muy estable y fuertemente asociada a leucocitos PMN (mieloperoxidasa).

Inicialmente, pusimos a prueba una serie de sustratos colormétricos y buffers de reacción en busca de aquellos que sean compatibles con nuestro formato de ensayo, tipo de muestra y las condiciones de almacenamiento de las mismas. Encontramos que una solución de TMB (3,3', 5,5' tetramethyl benzidine) en Buffer Citrato/Fosfato resulta adecuada y produce resultados consistentes utilizando muestras de exudado congeladas (LP) como fuente de enzima (ver Tabla 2).

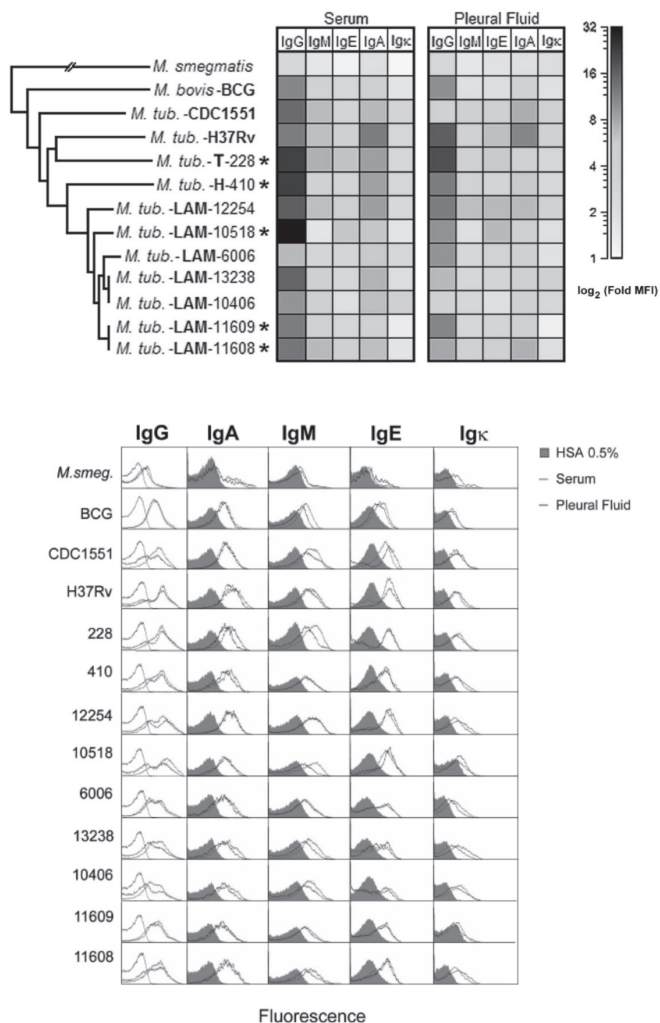


Figura 3. Matriz de valores de Intensidad de fluorescencia relativa (A.) e Histogramas representativos (B.) de la inmunoreactividad isotipo-específica de diferentes aislados clínicos locales y extranjeros de *Mtb*, BCG y *M.smegmantis*. Los aislados de *Mtb* multiresistentes a drogas se señalan con*.

Luego, determinamos las diluciones de las muestras en las cuales el ensayo resulta más sensible (Figura 4A). También establecimos el rango de tiempo de almacenado a -20°C en el cual la actividad enzimática permanece estable. Observamos que en muestras almacenadas entre 1000-1600 días la actividad enzimática no difería de la presente en muestras almacenadas de 0-400 días ($p>0,05$; Figura 4B) por lo que se infirió que la enzima resulta estable en el tiempo y temperatura indicados.

Tabla 2: Puesta a punto de un ensayo de Actividad Peroxidasa en LP de pacientes con TB.

Descripción del Procedimiento	A un volumen (vol.) de dilución de muestra a T°ambiente se le adiciona igual volumen de solución (sln.) de sustrato. La reacción (rxn) se deja proceder en oscuridad por 25minutos. Trascurrido este período, con 1 volumen de sln. stop se detiene la rxn y se mide la DO a 450nm restando 570nm.
Formato del Ensayo	Placa 96 pocillos de media área
Vol. de muestra (SP o LP)	2µl
Vol. y tipo de Buffer de dilución	20µl de Buffer Citrato/Fosfato 0,05M
Vol. y especificaciones de sln. de sustrato	20µl de TMB 0,006% w/vol./ 0,003% H ² O ² en Buffer Citrato/Fosfato 0,05M
Especificaciones de Sustrato elegido	Polvo estéril, Sigma
Solvente de reconstitución del sustrato	Etanol 100% (Solución stock 0,3% TMB)
Vol. de H ² O ² agregado a sln sustrato	2µl cada 10ml
Tipo, vol. y concetración de sln. stop	20µl H ² SO ⁴ 2N

3.2. Prueba de Hipótesis

Finalmente, aplicamos nuestro ensayo a una población de muestras pareadas de LP y SP (n=20) de pacientes con TB, a fin de estimar su valor diagnóstico. En tal sentido, no hallamos una tendencia estadísticamente significativa lo cual sugiere que esta enzima, a pesar de su estabilidad, no reúne las características necesarias para ser considerada como un biomarcador de interés (Figura 4C). Interesantemente, encontramos cierta compartimentalización en la actividad dado que pacientes que presentan alta actividad en LP presentan baja actividad en SP y viceversa (Figura 4D).

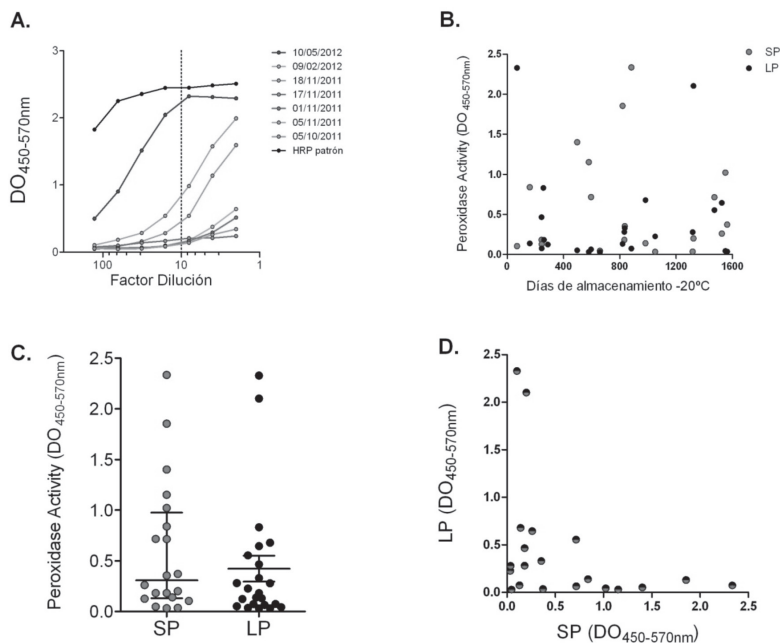


Figura 4. Actividad Peroxidasa en SP y LP de pacientes con TB. **A:** Puesta a punto de dilución óptima para el ensayo colorimétrico. **B:** Estudio de estabilidad de la actividad enzimática en función del tiempo de almacenado de las muestras a $-20^{\circ}C$. **C:** Estudio poblacional de la actividad de Peroxidasa en función del tipo de muestra. **D:** Análisis de correlación de la actividad enzimática medida en cada tipo de muestra.

4. INTERFERÓN GAMMA

4.1. In vivo: ELISA sándwich de LP y plasma sanguíneo (PB)

El LP de pacientes con tuberculosis es un exudado rico en células T efectoras que son reclutadas al sitio de infección en respuesta a la presencia de Ag micobacterianos. Estas células son del tipo TH1, por lo que son secretoras de citoquinas pro-inflamatorias como $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$. Tomando esto en consideración, decidimos evaluar el potencial diagnóstico de estas citoquinas en el diagnóstico diferencial de la pleuresía tuberculosa. Durante el presente

período, determinamos mediante un kit de ELISA comercial (e-Bioscience, L.A, USA) la cantidad de IFN-g en suero (BP) y LP a partir de una población de 27 pacientes tuberculosos. El resultado del estudio preliminar se resume en la figura 5. Pudimos evidenciar que la mencionada citoquina se encuentra altamente enriquecida en el LP respecto de la BP ($p<0.0001$, test pareado de Willcoxon) en la mayoría de los pacientes estudiados (25/27).

El presente resultado fuertemente sugiere que el IFN-g resulta ser un biomarcador muy promisorio para ser aplicado en el diagnóstico diferencial de la pleuresía tuberculosa, dado que se halla fuertemente compartimentalizado en el sitio lesional.

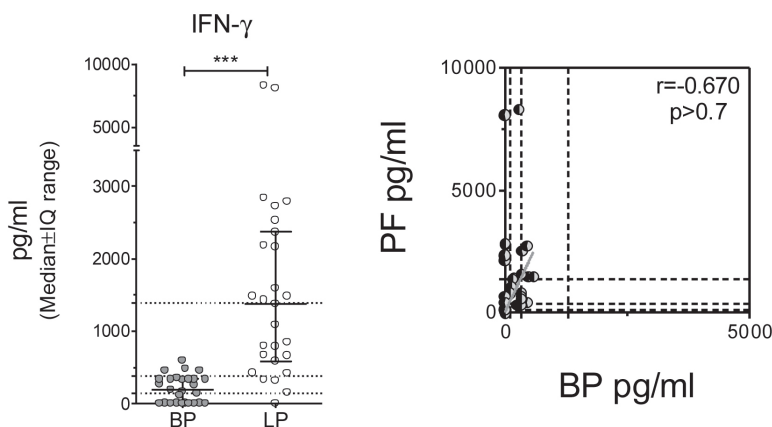


Figura 5. Dosaje de IFN-g en muestras de plasma (BP) y líquido pleural (LP) de pacientes con tuberculosis pleural activa. Resultados agrupados por tipo de muestra (Gráficos superiores) y correlación entre tipo de muestra dentro de cada paciente (Gráficos inferiores). * $p<0.0001$.**

4.2. Ex vivo: Citometría de Flujo

A partir de los resultados de la sección 4.1 y resultados previos (Losi et al. 2011, Eldin et al 2012, Schierloh et al 2012) decidimos identificar y caracterizar la funcionalidad cuales son las células productoras de IFN-g en LP y evaluar métodos para detectarlas. Para ello realizamos un análisis retros-

pectivo de muestras testeadas para producción intracitoplasmática de IFN- γ inducida por estimulación ex vivo con Mtb irradiado. Para este análisis incluímos derrames pleurales TB, derrames pleurales debidos a otras etiologías infecciosas como helmintiasis e infecciones paraneumónicas bacterianas y derrames pleurales secundarios a patologías malignas (adenomas y mesoteliomas) remitidos a nuestro laboratorio entre los años 2005-2010. Sólo se incluyeron muestras negativas para HIV.

El análisis de ROC (Receiver Operating Characteristic curve) arrojó que un bioensayo basado en% de linfocitos pleurales IFN- γ positivos es altamente predictivo para discernir entre derrame pleural tuberculoso y derrame pleural de otro origen ($p < 0.001$, datos no presentados). Más aún, realizando un análisis discriminado entre las poblaciones pleurales linfoides productoras de IFN- γ , observamos que las células Natural Killer presentan un mayor poder predictivo que las células T (Figura 6A), a pesar de que estas últimas, en función de su mayor número, aportan mayor cantidad neta de dicha citoquina al sobrenadante de cultivo (Figura 6B).

4.3. Ex vivo: ELISA sándwich de Medios Condicionados (MC).

En virtud de los promisorios resultados del ensayos de producción ex vivo de IFN- γ medido por citometría de flujo y teniendo en cuenta que la disponibilidad de este equipamiento es todavía infrecuente en los laboratorios de análisis clínicos de nuestro país, nos propusimos evaluar el mismo esquema anterior pero midiendo la secreción de dicha citoquina por ELISA (Figura 6B, panel derecho y datos no presentados). Nuestros resultados preliminares indican que este método presenta las características más promisorias debido a la alta sensibilidad y especificidad diagnóstica sumada al hecho de que su realización no requiere equipamiento sofisticado como la citometría de flujo.

RESUMEN

El diagnóstico de la Pleuresía tuberculosa plantea aún dificultades para la clínica dado esta afección comparte muchas características con otros exudados pleurales de origen maligno e infeccioso. En el presente estudio se describe el desarrollo y puesta a punto de una serie de metodologías de detección de biomarcadores a fin de evaluar su posible valor en la clasificación diferencial de exudados pleurales de distinto origen. Nuestros resultados indican que los ensayos basados en detección de Anticuerpos específicos

como así también la determinación de actividad peroxidasa en líquido pleural (LP) no presentan características que justifiquen su consideración como candidatos útiles. Por otro lado, tanto el interferón gamma (IFN- γ) endógeno presente en la efusión pleural como la producción de IFN- γ frente a la estimulación ex vivo con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), son predictores promisorios de pleuresía de origen tuberculoso (TB).

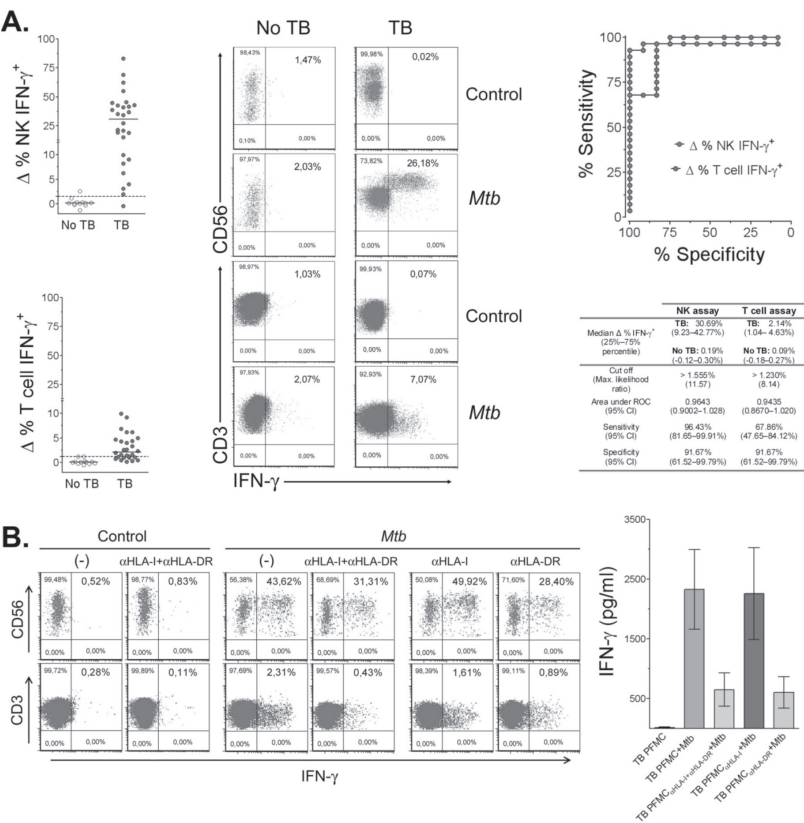


Figura 6. ROC análisis de ensayos de respuesta de interferón gamma (IFN-g) en células NK pleurales (rojo) y células T pleurales (violeta) (A.). Análisis de la contribución individual de cada población celular pleural (linfocitos T CD4 positivos, CD8 positivos y NK) a la producción total de IFN--g (B.).

ABSTRACT

Tuberculous pleurisy diagnosis still remains as an unresolved clinical issue given that this condition shares many characteristic with pleural exudates from infectious or malignant origin. In this study we describe development and implementation of several biomarker assays oriented to cluster pleural effusion of different origins. Our results show that specific Antibodies and pleural peroxidase activity do not exhibited enough capabilities to be considered as potential candidates. By contrast, pleural measurements and ex vivo production of gamma interferon are promising predictors of tuberculous pleurisy.

BIBLIOGRAFIA

1. Aleman M, de la Barrera SS, Schierloh PL, et al. 2005. *J Infect Dis.* 192(3):399-409.
2. Antony VB and Mohammed KA. 1999. *Semin Respir Infect.* 14: 9-17.
3. Balboa, L., M. M. Romero, J. I. Basile, C. A. Sabio y Garcia, P. Schierloh, et al. 2011. *J Leukoc Biol* 90:69-75.
4. Eldin EN, Omar A, Khairy M, Mekawy AH, Ghanem MK. *Ann Thorac Med.* 2012
5. Light, R. W. 2002. *N Engl J Med* 346:1971-1977.
6. Losi M, Bocchino M, Matarese A, et al. 2011. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 24(1):159-65.
7. Mutsaers SE. 2002. *Respirology.* 7(3):171-91.
8. Schierloh, P., S. De La Barrera, and M. Sasiain. 2012. INTECH. ISBN 979-953-307-698-979.
9. Schierloh P, Yokobori N, Geffner L, et al. 2009. *Eur J Immunol.* 39(9):2450-8.
10. Schierloh P, Yokobori N, Alemán M, et al 2007. *Infect Immun.* 75(11):5325-37.
11. Schierloh, P., M. Aleman, N. Yokobori, et al. 2005. *Immunology* 116:541-552.
12. Schierloh P, Yokobori N, Alemán M, et al. 2005. *J Immunol.* 175(10):6852-60.
13. Sharma RK et al. 2003 *Chest.*124:682-687.
14. Valway et al. 1998; *N Engl J Med* 338, 633-639
15. Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, et al. 2009. *Clin Exp Immunol.*157(3):385-94.
16. Zocchi L. 2002. *European Respiratory Journal.* 20: 1545–1558.

ESTUDIO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA COMO MEDIADOR DE LA RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON HERCEPTIN Y SU APLICACIÓN NUEVAS ESTRATEGIAS PRONOSTICAS

Martín Rivas, Florencia Mercogliano, Mercedes Tkach, Isabel Frahm,
Esteban Maronna, Roxana Schillaci
Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Vuelta de Obligado 2490,
(1428) Buenos Aires, Argentina

INTRODUCCIÓN

El TNFa es una citoquina que en la glándula mamaria favorece la proliferación, la ramificación morfogénica y modula la diferenciación funcional del epitelio mamario^{1,2}. En cáncer de mama se comprobó la existencia de una correlación positiva entre el número de macrófagos infiltrantes del tumor que expresan TNFa³ y el estadio del tumor mamario. Estas evidencias indican que el TNFa está presente en el microambiente tumoral y favorecería la progresión tumoral. En nuestro laboratorio, hemos demostrado que el TNFa es capaz de inducir el crecimiento *in vivo* e *in vitro* de las células del carcinoma de mama murino C4HD, a través de un mecanismo que requiere la activación del factor de transcripción NF-κB⁴. Recientemente comprobamos, por primera vez, que el TNFa induce la transactivación de ErbB-2 (HER-2), receptor con actividad tirosina quinasa intrínseca, y que lo utiliza para activar al factor de transcripción NF-κB y promover así el crecimiento celular en células de cáncer de mama murino y humanos que sobreexpresan ErbB-2⁵.

El ErbB-2 es una molécula clave en el cáncer de mama puesto que la señalización a través de este receptor contribuye a la transformación oncogénica. La sobreexpresión de ErbB-2 se detecta en aproximadamente un cuarto de todas las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama⁶. Estos tumores tienen un mayor potencial metastático y los pacientes tienen una menor supervivencia⁶. Por todo lo expuesto, el ErbB-2 ha sido utilizado como blanco terapéutico, en especial utilizando anticuerpos monoclonales como el trastuzumab (Herceptin®). Sin embargo, la experiencia clínica indica que sólo el 30% de los pacientes tratados con Herceptin responden al tratamiento⁷. Este hecho condujo al estudio de los mecanismos por los cuales los tumores que sobreexpresan ErbB-2 generan resistencia a la terapia con Herceptin. En

línea con ese objetivo, en el presente trabajo comprobamos que la sobreexpresión de TNF α puede conducir a la resistencia al tratamiento con Herceptin en células originalmente sensibles. Asimismo comprobamos tanto *in vivo* como *in vitro* que el bloqueo de TNF α recupera la sensibilidad a la Herceptin en células resistentes. Por último, pudimos comprobar la expresión de TNF α en biopsias de carcinomas mamarios ductales infiltrantes.

MATERIALES Y METODOS

Líneas celulares, ensayos de proliferación celular y apoptosis

La línea celular de cáncer de mama humano BT-474 proviene de la ATCC, mientras que las JIMT-1 de la DSMZ⁸. Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 o DMEM con 10% de suero fetal bovino, respectivamente. Se utilizó 10mg/ml Herceptin (Roche) o de 5 mg/ml Etanercept (Wyeth), determinándose la proliferación celular por incorporación de timidina [^3H] a las 72 h de cultivo y por octuplicado, como describimos anteriormente⁹.

Transfecciones transientes

Los ARN de interferencia (ARNi) dirigidos contra el ARNm del TNF α fueron sintetizados por Dharmacon, Inc (Lafayette, CO) Un oligonucleótido cuya secuencia no es alineable con blancos celulares fue usado como control negativo (Dharmacon). La transfección fue realizada usando el reactivo de transfección DharmaFECT con 100 nM de ARNi durante 72 horas y verificamos la efectividad de la inhibición de la proteína correspondiente por Western blot (Figura 2C). La transfección con el plásmido pSV2neo-TNF α o con el plásmido pSV2 neo como control se realizó con FUGENE verificando la efectividad de la transfección del TNF α por Western blot (Fig 1B).

Crecimiento del tumor JIMT-1 in vivo

Ratones hembras vírgenes *nude* fueron inoculados subcutáneamente (s.c.) en el flanco izquierdo con 3×10^6 células JIMT-1. El ancho (A) y largo (L) del tumor fueron medidos con calibre tres veces por semana, y el volumen tumoral (mm^3) se calculó como $(L \times A^2)/2$. Cuando los tumores se hicieron palpables, los animales fueron tratados como se detalla: 1) IgG humana 5 mg/kg, dos veces por semana; 2) etanercept 5 mg/kg, dos veces por semana; 3) trastuzumab 5 mg/kg, una vez por semana e IgG humana 5 mg/kg una vez

por semana; o 4) etanercept 5 mg/kg dos veces por semana + trastuzumab 5 mg/kg una vez por semana.

Análisis histopatológico

Al finalizar los experimentos, los tumores fueron removidos fijados en formol neutro 10% e incluidos en parafina. Se realizó tinción con hematoxilina-eosina (H&E) para realizar el análisis histopatológico.

Inmunohistoquímica

Las determinaciones se realizaron por inmunohistoquímica en cortes de parafina de 5 mm de espesor utilizando los anticuerpos anti TNF α (Abcam AB1793 1:50) o el anti ErbB-2 A0486 (Dako, 1:250). Se utilizarán como sistema de detección Envision (Dako Cytomation) Estos ensayos fueron realizados y cuantificados por los Dres. Isabel Frahm y Esteban Maronna, patólogos del Servicio de Patología y Biología Molecular del Sanatorio Mater Dei.

Western blot

Las proteínas fueron obtenidas de extractos celulares como se describió previamente⁹ y sometidas a SDS-PAGE. Luego se utilizó para detectar las proteínas en estudio los siguientes anticuerpos: anti- TNF α , fosfo ErbB-2 (Cell Signaling), ErbB-2 (Santa Cruz), actina y tubulina (Neomarkers). Posteriormente se utilizó ECL para revelar.

Análisis estadístico

Las diferencias entre el control y los grupos experimentales fueron analizadas mediante ANOVA, seguida por prueba t de Tukey

RESULTADOS

La expresión de TNF α favorece la resistencia a la acción de la Herceptin en células de cáncer de mama que sobreexpresan ErbB-2

Es sabido que las células BT-474 son células sensibles a tratamiento con Herceptin, provocando la inhibición en su proliferación. Sin embargo, la transfección de estas células con un plásmido que codifica el TNF α , fue capaz de aumentar la proliferación de éstas células y de hacerlas resistentes al tratamiento con Herceptin (Figura 1A). Asimismo el aumento de síntesis de TNF α inducido por la mencionada transfección provocó un aumento en

la fosforilación de ErbB-2 de forma similar a lo demostrado previamente por nosotros por el agregado exógeno de TNF α (Figura 1B).

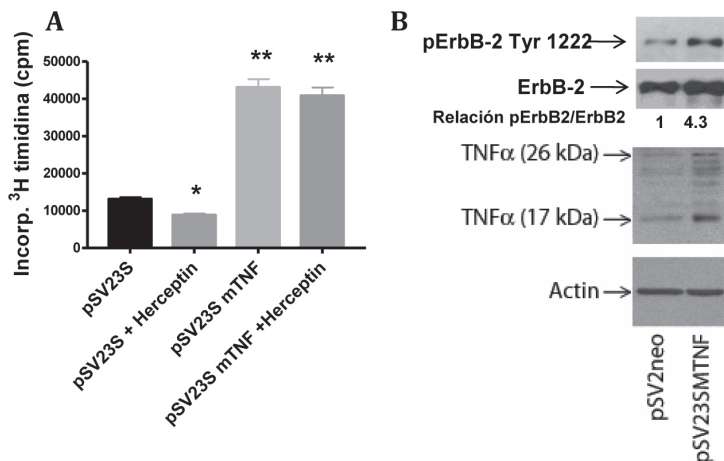


Figura 1 Efecto de la producción de TNF α endógeno sobre la acción de la Herceptin. (A) Las células BT-474 fueron transfectadas con un vector de expresión de TNF α o con el correspondiente vector vacío y fueron tratadas con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Herceptin. Se realizó un ensayo de proliferación por incorporación de ^3H timidina a las 48h de cultivo. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$. (B) Western blot comprobando la efectividad de la transfección del plásmido de TNF α y la fosforilación de ErbB-2.

El bloqueo de TNF α sensibiliza a la acción de la Herceptin

Las células JIMT-1 son resistentes al tratamiento con Herceptin, producen TNF α y expresan el receptor de TNF α tipo 1 (TNFR1), principal mediador de los efectos de TNF α en cáncer de mama (Figura 2A). Con el objeto de demostrar si el TNF α participa de la resistencia de esta línea celular a la Herceptin, quisimos bloquear su expresión. Para ello utilizamos ARN de interferencia (ARNi) contra TNF α y determinar si afectaba la proliferación celular en presencia de Herceptin. Como se observa figura 2B, el bloqueo de TNF α no modificó la proliferación de las células JIMT-1. Sin embargo, el tratamiento simultáneo con Herceptin en células JIMT-1 que no pueden sintetizar TNF α , resultó en la inhibición de la proliferación celular. Teniendo en cuenta estos hallazgos, quisimos determinar lo que sucede en una situación *in vivo*. Para ello, inyectamos células JIMT-1

en ratones *nude* y, cuando el tumor fue palpable, se administró i.p. el anticuerpo bloqueante de TNF α , etanercept, Herceptin o los dos anticuerpos de forma simultánea. Como control, un grupo de ratones recibió IgG humana. Al día 32 observamos que el tratamiento con etanercept o Herceptin no modificó el crecimiento del tumor. Sin embargo, la administración simultánea de ambos anti-cuerpos inhibió el crecimiento tumoral en un 54% (Tabla 1).

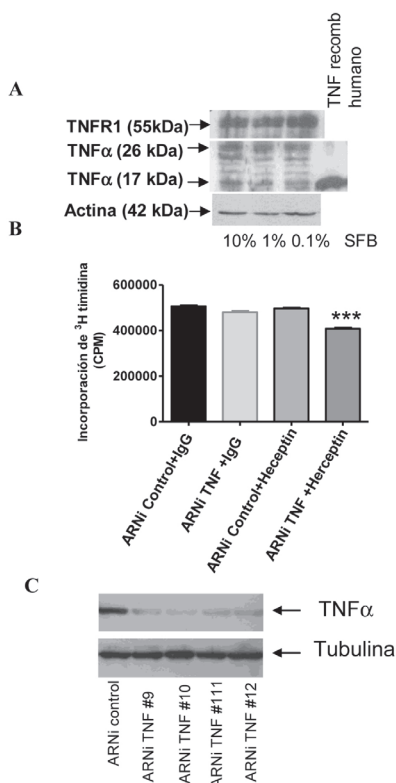


Figura 2. Bloqueo de TNF α en células JIMT-1. (A) Las células JIMT-1 fueron cultivadas en presencia de distintas concentraciones de suero fetal bovino (SFB) y se determinó la expresión de TNF α y del receptor de TNF α tipo 1 (TNFR1) por Western blot a las 48 de cultivo. (B) Las células fueron transfectadas con 100 nM ARNi de TNF α durante 3 días o ARNi control y luego se agregó 10mg/ml de Herceptin o IgG humana por 48h determinándose la proliferación celular por incorporación de ^3H timidina. $P < 0.001$. (C) Efectividad de los ARNi de TNF α utilizados.

El análisis histopatológico, mostró que los tumores del grupo tratado con la IgG humana tuvieron un patrón de crecimiento sólido, acordonado, con un alto número de figuras mitóticas por campo (Figura 3). Como era esperable para este tumor, dado su conocida resistencia a la Herceptin, el tratamiento con Herceptin no modificó notablemente las características histopatológicas del tumor. Sin embargo, el tratamiento con etanercept, se tradujo en un aumento en el porcentaje de necrosis, que presentó un patrón geográfico. Si bien el patrón de crecimiento tumoral continuó siendo columnar, se advirtieron un mayor número de formaciones pseudoductales. El número de figuras mitóticas por campo de alto aumento en la zona viable del tumor, por su parte, fue significativamente menor (4-6 mitosis por campo en el grupo IgG vs. 1-2 por campo en los grupos etanercept o etanercept + Herceptin). Una característica que cabe mencionar en los tumores del grupo tratado con Herceptin + etanercept, fue la presencia de zonas de hialinización, considerado un signo franco de involución del tumor (Figura 3).

Para poder comenzar a estudiar un posible mecanismo por el cual el etanercept sensibiliza a las células JIMT-1 al tratamiento con Herceptin, realizamos una inmunohistoquímica de ErbB-2 de los tumores obtenidos. Notablemente, el tratamiento con etanercept resultó en un aumento de la marcación para el ErbB-2 en los tumores JIMT-1: observamos que los tumores provenientes del grupo control (IgG), Herceptin o Herceptin + etanercept se distribuyeron en 1+ y 2+, y llamativamente los del grupo etanercept fueron en su mayoría 3+ (4 de 5) y 2+ (1 de 5) (Figura 3). Estudios realizados por Western blot, revelan que el bloqueo de TNF α no aumenta la expresión de ErbB-2 (datos no mostrados). Estos resultados sugerirían que el bloqueo de TNF α lograría una mayor exposición de ErbB-2 en la membrana plasmática de las células tumorales.

Estos resultados en su conjunto sugieren que el TNF α es un factor que promueve la resistencia a Herceptin y que al impedir la acción de esta citoquina, las células tumorales recuperan la sensibilidad a Herceptin.

Los experimentos se realizaron en ratones nude inyectando 3×10^6 cel. Cuando el tumor fue palpable, los animales se inyectaron con Herceptin (5 mg/kg, una vez por semana), etanercept (5 mg/kg, dos veces por semana), o la combinación de ambos, o con una IgG humana como control. El volumen tumoral se estimó usando la fórmula $(L \times A^2)/2$, donde L es la longitud del tumor y A el ancho. Los resultados mostrados corresponden al día 32

Tabla 1. Inhibición del crecimiento del tumor JIMT-1 xenoigertado en ratones nude por tratamiento con etanercept y Herceptin

Tratamiento	Vol. tumoral (mm ³)	% inib. Crecim
	(media ± SE)	
IgG humana	217,6 ± 40,3	
Herceptin	219,7 ± 38,8	
Etanercept	217,7 ± 37,0	
Herceptin + etanercept	99,9 ± 10,7	54,1

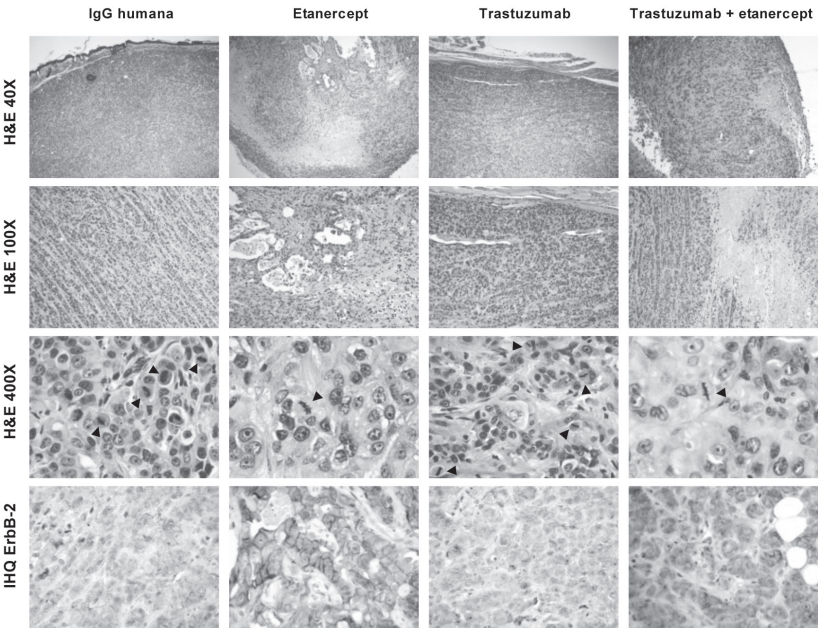


Figura 3 Cambios histopatológicos en tumores JIMT-1 que recibieron tratamiento con etanercept, Herceptin (trastuzumab) o etanercept + Herceptin. Tumores JIMT-1 extirpados de ratones nude que recibieron tratamiento con IgG humana, etanercept, trastuzumab o ambas drogas en combinación fueron fijados en formaldehído y parafinados. Cortes de 4 µm fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Se muestran secciones representativas de cada grupo de tumores. En la parte inferior de la figura se muestra el resultado de la inmunohistoquímica (IHQ) para ErbB-2 en tumores de los cuatro grupos puntuados como 1+, 3+, 1+ y 2+ respectivamente

Estudio de la expresión de TNF α en biopsias de pacientes con cáncer de mama

Reunimos una cohorte de 20 pacientes diagnosticados con carcinoma de mama ductal invasivo cuyas biopsias fueron obtenidas antes de su tratamiento. Como control, utilizamos tejido mamario obtenido de mujeres sometidas a cirugía de reducción mamaria. Pudimos observar que en las biopsias de cáncer de mama la marcación de TNF α era intensa y predominantemente nuclear, mientras que en las biopsias normales, la tinción era citoplasmática y débil. En la figura 4 se observan las tinciones de 3 carcinomas representativos.

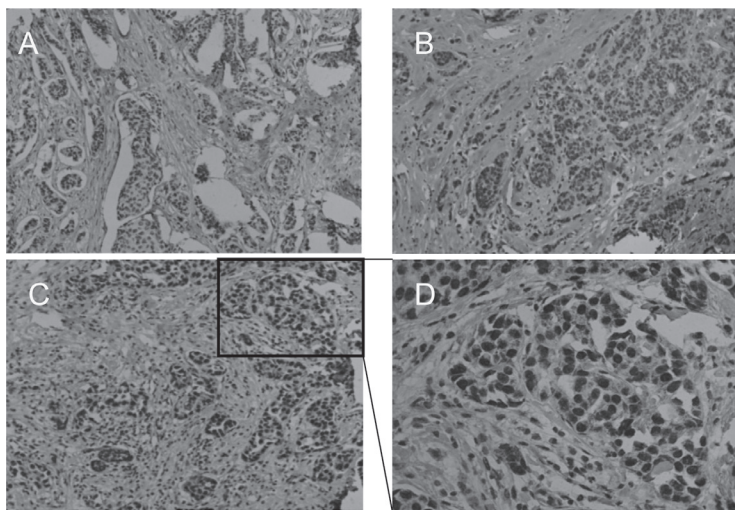


Figura 4. Inmunohistoquímica de TNF α en biopsias de pacientes con carcinomas mamarios ductales invasivos. La inmunohistoquímica se realizó como se detalla en Materiales y Métodos. (A)-(C) muestras representativas de 3 pacientes. Magnificación 100X. (D) Magnificación 400X de la muestra (C).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos mostrado evidencias que el TNF α juega un importante papel en la resistencia al tratamiento con Herceptin en células de cáncer de mama que sobreexpresan ErbB-2. Por una parte, comprobamos en células sensibles a la acción de Herceptin, que la sobreexpresión de TNF α conduce a la pérdida de respuesta a Herceptin. Esto se comprobó a través de

ensayos proliferación celular en la línea BT-474. Por otra parte, utilizamos un modelo de células de cáncer de mama resistentes a Herceptin, como son las células JIMT-1. En estas células comprobamos que el bloqueo de la síntesis de TNFa, utilizando ARNi, conducía a que la Herceptin pudiera inhibir el crecimiento celular. Para poder obtener una evidencia pre-clínica que sustente el hecho que el bloqueo de TNFa puede favorecer la sensibilidad a Herceptin, se realizaron experimentos *in vivo* con las células JIMT-1. Los xenoingertos de JIMT-1 en ratones *nude* fueron tratados con etanercept, anticuerpo monoclonal de amplio uso en el tratamiento de artritis reumatoidea¹⁰, con Herceptin o con ambos anticuerpos. Observamos que el tratamiento combinado de etanercept y Herceptin indujo una marcada inhibición en el crecimiento tumoral. Al estudiar una posible causa por la cual el bloqueo de TNFa sensibiliza a las células al tratamiento con Herceptin, realizamos una IHQ de ErbB-2. Así comprobamos que la neutralización del TNFa por Etanercept induce un desenmascaramiento del ErbB-2 en la membrana plasmática. Esto pudo ser debido a que en la línea celular JIMT-1 el ErbB-2 se halla asociado a MUC-4¹¹. Posiblemente, el TNFa intervenga en la síntesis/expresión de mucinas.

Por último, comprobamos que el TNFa está presente en biopsias de tumores de mama infiltrantes. Futuros estudios revelarán si existe correlación entre la expresión de TNFa, la activación de ErbB-2 y la sobrevida de los pacientes tratados con Herceptin.

ABSTRACT

Tumor necrosis factor alpha (TNFa) is a pleiotropic cytokine which, acting locally, induces tumor growth. Accumulating evidence, including our findings, showed that TNFa is mitogenic in breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, we have already demonstrated that TNFa is able to transactivate ErbB-2 and to induce proliferation even in presence of Herceptin. In the present study, we explored TNFa involvement on Herceptin resistance on highly aggressive ErbB-2-overexpressing breast cancer cells. We found that overexpression of TNFa in BT-474, Herceptin-sensitive cells, turns them to a resistant phenotype. Moreover, *in vivo* and *in vitro* experiments using JIMT-1, Herceptin-resistant cells, showed that blockage of TNFa turns the cells sensitive to Herceptin treatment. This effect was evident by the inhibition of proliferation of JIMT-1 with Herceptin, when TNFa synthesis was abolished by transfection with small interference RNA. Moreover, JIMT-1 xenograft growth

was inhibited by a 54% along with the simultaneous administration of the anti-body anti TNF α , etanercept, together with Herceptin. We disclosed that blockage of TNF α enhanced ErbB-2 exposure in the plasma membrane of JIMT-1, suggesting a possible mechanism by which Herceptin become effective in this cells. We also detect TNF α expression in invasive ductal breast cancer specimens, highlighting the relevance of this cytokine in this disease.

REFERENCIAS

1. Varela LM, Ip MM. 1996. Tumor necrosis factor-alpha: a multifunctional regulator of mammary gland development. *Endocrinology* 137:4915-24
2. Lee PP, Hwang JJ, Murphy G, Ip MM. 2000. Functional significance of MMP-9 in tumor necrosis factor-induced proliferation and branching morphogenesis of mammary epithelial cells. *Endocrinology* 141:3764-73
3. Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR. 1994. Expression of tumour necrosis factor (TNF alpha) and its receptors in benign and malignant breast tissue. *Int. J. Cancer* 56:777-82
4. Rivas MA, Carnevale RP, Proietti CJ, Rosembliit C, Beguelin W, Salatino M, Charreau EH, Frahm I, Sapia S, Brouckaert P, Elizalde PV, Schillaci R. 2008. TNFalpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappaB-dependent pathways. *Exp. Cell Res.* 314:509-29
5. Rivas MA, Tkach M, Rosembliit C, Beguelin W, Sundblad V, Diaz Flaqué C, Charreau EH, Elizalde PV, Schillaci R. 2009. Tumor necrosis factor transactivates ErbB2 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 69 suppl2:273
6. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/ neu oncogene. *Science* 235:177-82
7. Hynes NE, Lane HA. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 5:341-54
8. Tanner M, Kapanen AI, Junttila T, Raheem O, Grenman S, Elo J, Elenius K, Iso-la J. 2004. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* 3:1585-92
9. Rivas MA, Tkach M, Beguelin W, Proietti CJ, Rosembliit C, Charreau EH, Elizalde PV, Schillaci R. 2010. Transactivation of ErbB-2 induced by tumor necrosis factor alpha promotes NF-kappaB activation and breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res. Treat.* 122:111-24
10. Murray KM, Dahl SL. 1997. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75) Fc fusion protein (TNFR:Fc) in rheumatoid arthritis. *Ann. Pharmacother.* 31:1335-8
11. Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, Jovin TM. 2005. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res.* 65:473-82

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS Y MOLECULARES EN MIELOMA MÚLTIPLE. SU SIGNIFICADO CLÍNICO.

Irma Slavutsky, Julieta Panero, Flavia Stella

Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina

RESUMEN

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia 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. Presenta amplia heterogeneidad en su comportamiento clínico, con pacientes que presentan larga sobrevida y otros que muestran rápida progresión de la enfermedad. Si bien durante las últimas décadas se han logrado notables avances en la identificación de factores pronóstico, el perfil genético del tumor surge como el más importante en relación al pronóstico y la respuesta al tratamiento. Esto indica la necesidad de ahondar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de esta neoplasia y marca la importancia de la búsqueda de nuevos marcadores genéticos capaces de identificar subgrupos de pacientes con diferente evolución clínica. En ese contexto, el objetivo del presente estudio fue profundizar la caracterización citogenética y citomolecular de las anomalías cromosómicas secundarias en MM y evaluar la expresión de los genes *MCL-1*, *DKK1* y *GSTP1*, de probable asociación clínica, así como los cambios en la expresión de los genes asociados a telómeros: *TRF2*, *TANK1*, *POT1* y *hTERT*, y correlacionar estos datos con los factores pronóstico de la enfermedad. Se evaluaron 54 pacientes con MM (35 varones; edad media: 68 años; rango: 30-87 años). Se realizó cultivo de MO y análisis citogenético con bandeo G complementado con FISH (fluorescence in situ hybridization) y Multi-FISH. El análisis de expresión génica se efectuó mediante PCR en tiempo real (QRT-PCR). El análisis cromosómico permitió detectar 12 casos con 32 rearrreglos estructurales nuevos: 22 translocaciones, 1 delección, 3 pseudodicéntricos, 2 duplicaciones y 4 rearrreglos complejos. El cromosoma 1 fue el más involucrado con anomalías que generaron fundamentalmente ganancias de 1q. Los pacientes con alte-

raciones nuevas presentaron niveles aumentados de β_2 microglobulina (β_2 M), calcio ($p=0,0001$), lactato deshidrogenasa (LDH) e infiltración de la MO (IMO) ($p=0,0005$), y disminución de hemoglobina ($p=0,029$), con respecto al grupo control. El 90% de estos pacientes presentaron lesiones líticas, respecto del 50% observado en los controles ($p=0.032$). El análisis de expresión de los genes *MCL-1*, *DKK1* y *GSTP1* mostró un alto grado de heterogeneidad. El 21% de los pacientes mostró sobreexpresión de *MCL1*, el 43% de *GSTP1* y el 36% de *DKK1*, con diferencias significativas respecto de los controles ($p\leq 0,04$). Se observó una fuerte correlación entre *DKK1* y *GSTP1* ($p<0,0001$). La expresión de *MCL-1* mostró una correlación positiva con los niveles de β_2 M ($p=0,0068$), y *DKK1* presentó asociación significativa con el porcentaje de IMO ($p=0,0498$). La expresión de *GSTP1* no mostró asociación con los parámetros clínicos. Los genes *TRF2*, *POT1*, *TANK1* y *hTERT* presentaron un aumento significativo de su expresión respecto de los controles ($p\leq 0,04$). Se observó una buena correlación entre *TRF2* y *POT1* ($p=0,002$), de *hTERT* con *TANK1* y *TRF2* ($p<0,0001$), y de *TANK1* con *TRF2* ($p<0,0001$) y *POT1* ($p=0,01$). La correlación con los parámetros clínicos permitió observar que *POT1* presentaba el mayor nivel de asociación, encontrándose sobreexpresión en los pacientes con estadios avanzados de la enfermedad ($p=0,0001$), en casos con alto porcentaje de IMO ($p=0,01$), altos niveles de β_2 M ($p=0,03$) y calcio ($p=0,005$), con bajos niveles de hemoglobina ($p=0,008$) y con manifestaciones óseas ($p=0,0008$); *TRF2* se encontraba asociado con alto porcentaje de IMO ($p=0,001$), altos niveles de calcio ($p=0,04$) y aumento de lesiones líticas ($p=0,01$), en tanto que *TANK1* y *hTERT* se asociaron con IMO ($p=0,02$ y $p=0,03$, respectivamente). El parámetro clínico de mayor correlación fue la IMO, que también se encontró asociada negativamente con la LT ($p=0,02$). Estos estudios resultan de interés teniendo en cuenta la existencia de protocolos con inhibidores de la telomerasa, en este momento en etapa experimental.

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a clonal neoplasm characterized by the accumulation of malignant plasma cells within the bone marrow (BM). This malignancy shows a great variability in clinical course, with patients evolving in a few weeks, while others may enjoy a more than 10-years survival. The genetic tumor profile is considered one of the most important prognostic factors. This

determines the importance to find new genetic markers to identify subgroups of patients with different clinical evolution. In this context, the objective of this study was the cytogenetic and molecular cytogenetic characterization of secondary chromosome alterations in MM, the expression analysis of *MCL-1*, *DKK1* and *GSTP1* genes, of probable clinical significance, the evaluation of changes in the expression of *TRF2*, *TANK1*, *POT1* and *hTERT* genes, associated to telomere length regulation, and their correlation with prognostic factors of the disease. A total of 54 patients with MM (35 males; mean age: 68 years; range: 30-87 years), were evaluated. BM cells were processed for cytogenetic and FISH (fluorescence in situ hybridization) and Multi-FISH analysis by direct method and/or short-term culture. G-banding technique was used. Gene expression analysis was performed by real time PCR. Cytogenetic analysis detected 12 patients with new chromosomal alterations, most of them involving chromosome 1 that showed a strong association with clinical parameters. Expression analysis of *MCL-1*, *DKK1* and *GSTP1* genes showed a weak correlation with prognostic factors. In addition, telomere-associated genes had a strong correlation with bone marrow plasma cell infiltration, β_2 microglobulin and lactate dehydrogenase levels, being *POT1* the most frequently involved gene, suggesting the importance of these genes in the process of development and/or progression of MM. These studies became important considering the new therapeutic approaches with diverse telomere targeting inhibitors and suggest that a number of MM patients may be particularly sensitive to telomere-damaging drugs.

DETECCIÓN DE DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD EN ENTEROCOCCUS SPP. RECUPERADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Mónica D. Sparo; María M. De Luca; Celia M. Schell
Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas.
Universidad Nacional de La Plata. 60 y 120 s/n. (1900).
La Plata, Buenos Aires, Argentina

INTRODUCCIÓN

El género *Enterococcus* se ubica dentro del Orden *Lactobacillales* y pertenece a la Familia *Enterococcaceae*. Presenta antígeno grupo específico D, según la clasificación de Rebecca Lancefield (Suárez, 2002).

Actualmente, sobre la base de la evidencia filogenética apoyada en estudios de secuenciación rRNA 16S y/o de hibridación ADN-ADN, han sido propuestas más de 40 especies como integrantes de este género (Euzéby, 2012).

Los enterococos integran la microbiota autóctona del tracto intestinal del hombre y animales. Su patogenicidad es controvertida y se la puede relacionar con la presencia de diferentes determinantes de virulencia codificantes de factores como la proteína unida al colágeno (*ace*), antígeno de endocarditis (*efaA*), activador de hemolisina (*cylA*), gelatinasa (*gelE*), sustancias de agregación (*asa1* y *asa373*) y proteína de superficie (*esp*). Adicionalmente, los carbohidratos de la pared celular o los sitios de unión de la fibronectina que favorecen la adherencia a los tejidos del huésped pueden participar en la patogenicidad. (Jett *et al.*, 1994; Eaton & Gasson, 2001; Sánchez Valenzuela *et al.*, 2008).

Existe escasa bibliografía acerca de los factores de virulencia que condicionan la patogenicidad de los enterococos ya que las diferencias entre cepas de enterococos potencialmente patógenas y saprófitas no están aún dilucidadas (Foulquie-Moreno *et al.*, 2006; Marget *et al.*, 2008).

Los enterococos con determinantes de patogenicidad y de resistencia a los ATM pueden ingresar al hombre a través de la cadena alimenticia, por lo tanto es relevante su investigación en las distintas regiones de Argentina.

El **objetivo** de este proyecto fue detectar los determinantes de patogenicidad en *Enterococcus* spp. recuperados de alimentos de origen animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó mediante un diseño observacional, descriptivo, prospectivo y de corte transversal.

Las muestras representativas de diversos alimentos, elaborados y comercializados en establecimientos minoristas fueron tomadas al azar tanto de la zona céntrica (ZC) como de la zona periférica (ZP) de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires (*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*; APHA, 2001).

Los alimentos artesanales seleccionados para la recuperación de *Enterococcus* spp. fueron a) alimentos cárnicos (salames, salamines, hamburguesas); y b) alimentos lácteos (quesos semiduros de oveja y de vaca). Las muestras fueron recolectadas durante un año en 4 series:

Para el procesamiento de las muestras se tomaron tres piezas de cada tipo de alimento y se procesaron siguiendo la metodología recomendada por APHA (2001).

La caracterización se realizó mediante pruebas fenotípicas convencionales, siguiendo la metodología propuesta por Facklam y Washington (1991) y Sparo y Mallo (2001).

En aquellas especies de *Enterococcus* que no se pudieron caracterizar se aplicó el análisis de perfiles electroforéticos mediante SDS-PAGE de proteínas solubles, de acuerdo a Sparo *et al.*, (2008).

Los aislamientos se almacenaron por triplicado a -20°C y a -70°C en 1 mL de caldo BHI con glicerol (30%).

La expresión de Hemolisina, Gelatinasa y Sustancia Agregativa se investigó de acuerdo a la metodología descrita por Sparo *et al* (2006).

La investigación de *gelE*, *cylA*, *esp* y *efaA* se realizó mediante PCR múltiple; de acuerdo a lo descrito por Dupré *et al.* (2003) y Sparo *et al.* (2008).

Para la investigación de los genes *asa1*, *asa373* y *ace* se realizó PCR Múltiple; de acuerdo a lo descrito por Dupré *et al.*, 2003.

La resistencia intrínseca a vancomicina (VAN) se determinó mediante el desarrollo en agar BHI con 6,0 mg/L del antimicrobiano.

Se investigó la producción de b-lactamasa por el método de la cefalosporina cromogénica (Cefinase BBL, EE.UU.). Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para ampicilina (AMP) y VAN, siguiendo las recomendaciones del CLSI (2010, EE.UU.).

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa SPSS versión 11.5 para Windows, aplicando la prueba estadística Chi cuadrado

(X^2). Se consideró estadísticamente significativo el hallazgo de valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se recuperaron un total de 120 aislamientos de enterococos. *E. faecalis* fue la especie más frecuentemente recuperada en alimentos de origen cárnico. Sin embargo, *E. faecium* fue la especie aislada con mayor frecuencia en quesos de oveja y vaca. Otras especies, como *E. avium*, *E. durans* y *E. hirae*, fueron detectadas en alimentos de origen lácteo.

El estudio de la resistencia antimicrobiana evidenció que *E. faecalis* no presentó resistencia a VAN (rango de CIM= 0,12-1,00 µg/mL). En alimentos de origen cárnico, la totalidad de los aislamientos de *E. faecium* fueron resistentes a VAN (rango de CIM= 32-512 µg/mL).

La resistencia a AMP mediante la producción de β -lactamasa fue de 3,0% (**Tabla I**).

Tabla I. Resistencia antimicrobiana a vancomicina y ampicilina en *Enterococcus* spp. aislados de alimentos de origen animal. 2010-2012.

ORIGEN	ESPECIE AISLADA	B-lasa Rango de CIM (µg/mL) van* amp*	n (aislamientos)
Salamines, salames	<i>E. faecalis</i>	1 0,25-1,00 0,125- 64	24
	<i>E. faecium</i>	0 64-512 16-64	6
Hamburguesas	<i>E. faecalis</i>	0 0,25-1,00 0,50-2,00	30
	<i>E. faecium</i>	0 32-256 16-32	3
Quesos de oveja	<i>E. faecium</i>	0 2,00-1024 8,00-64	22
	<i>E. faecalis</i>	1 0,12-0,50 0,25-64	6
	<i>E. hirae</i>	0 0,25 0,12	1
	<i>E. avium</i>	0 0,12 1,00	1
Quesos de vaca	<i>E. faecium</i>	0 4,00-512 4,00-64	23
	<i>E. faecalis</i>	0 0,12-1,0 1,00-2,00	3
TOTAL	<i>E. durans</i>	0 0,50 1,00	1
			n = 120

B-lasa: b-lactamasa, CIM: concentración inhibitoria mínima, van*: vancomicina, amp*: ampicilina.

El principal reservorio de enterococos con resistencia a ampicilina fue el queso de vaca, aunque no se observó una diferencia significativa con los otros tipos de alimentos ($p > 0,05$). En las hamburguesas la mayor parte de los aislamientos resultaron sensibles ($p < 0,05$).

El queso de vaca fue el reservorio más importante de aislamientos con resistencia a VAN; sin embargo no se detectó una diferencia significativa ($p > 0,05$) con las otras variedades de alimento de origen cárnico y lácteo analizadas.

Los factores de virulencia de *Enterococcus* spp. recuperados de alimentos de origen se muestran en la **tabla II**.

Las hamburguesas conformaron de forma significativa ($p < 0,05$) el principal reservorio de enterococos con factores de virulencia (Gel, Hem y AS). En el queso de vaca se detectó una menor cantidad de aislamientos con factores de virulencia, con ausencia en la expresión de Hem. En general, en todos los alimentos analizados, el factor de virulencia predominante fue Gel.

Tabla II. Factores de virulencia detectados en *Enterococcus* spp. recuperados de alimentos de origen animal.

	<i>E. faecium</i>	1 0 1	3
Quesos de oveja	<i>E. faecium</i>	0 0 2	22
	<i>E. faecalis</i>	3 1 3	6
	<i>E. hirae</i>	1 0 0	1
	<i>E. avium</i>	0 0 0	1
Quesos de vaca	<i>E. faecium</i>	1 1 1	23
	<i>E. faecalis</i>	2 1 1	3
TOTAL	<i>E. durans</i>	0 0 0	1
			n = 120

Gel: gelatinasa. Hem: hemolisina. AS: sustancia agregativa

La distribución integral de los distintos determinantes genéticos de patogenicidad en los diferentes aislamientos se presenta en la **tabla III**.

En *E. faecalis* proveniente de productos fermentados de origen cárnico se detectaron determinantes de virulencia en 22/24 aislamientos y en ham-

burguesas en 30/30. En la especie *E. faecium* de queso de oveja se observó genes de virulencia en 15/22 aislamientos y en queso de vaca en 16/23.

En las especies recuperadas en menor frecuencia, solo en *E. hirae* se detectó *gel*. El gen *cytA* solo se observó en la especie *E. faecalis* (Tabla III).

En la **Tabla IV** se muestran las asociaciones de determinantes de virulencia en aislamientos de *Enterococcus* spp. a partir de alimentos de origen animal.

Los determinantes de virulencia que codifican para gelatinasa y hemolisina (*gel*, *cytA*) se detectaron de forma significativa ($p < 0,05$) en aislamientos de enterococos que no expresaron fenotípicamente sus respectivos factores Gel y Hem.

No se observó relación entre la presencia de resistencia a AMP y a VAN y de los determinantes genéticos de virulencia ($p > 0,05$).

Tabla III. Determinantes genéticos de virulencia detectados en *Enterococcus* spp.

ORIGEN	ESPECIE AISLADA	n (DV*)							n (aislamientos)
		<i>cytA</i>	<i>gel</i>	<i>esp</i>	<i>efa</i>	<i>asa1</i>	<i>asa373</i>	<i>ace</i>	
Salamines, salames	<i>E. faecalis</i>	7	9	15	4	14	14	7	24
	<i>E. faecium</i>	0	0	4	0	2	2	0	6
Hamburguesas	<i>E. faecalis</i>	14	18	19	2	17	17	10	30
	<i>E. faecium</i>	0	0	1	0	0	0	0	3
Quesos de oveja	<i>E. faecium</i>	0	0	15	0	8	9	0	22
	<i>E. faecalis</i>	3	1	3	1	1	2	3	6
	<i>E. hirae</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
	<i>E. avium</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
Quesos de vaca	<i>E. faecium</i>	0	12	16	0	10	11	0	23
	<i>E. faecalis</i>	2	1	1	0	1	1	2	3
	<i>E. durans</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
TOTAL									n = 120

DV*: determinantes genéticos de virulencia. *gel* (gelatinasa), *cytA* (hemolisina), *esp* (adhesina de superficie), *efa* (antígeno de endocarditis), *asa1* y *asa373* (sustancia agregativa), *ace* (antígeno de unión al colágeno).

Tabla IV. Asociación de determinantes de virulencia en *Enterococcus* spp. a partir de alimentos de origen animal.

ORIGEN	ESPECIE	DETERMINANTES DE VIRULENCIA	AISLAMIENTOS
Salamines, salames	<i>E. faecalis</i>	<i>asa 1 + asa373 + esp</i>	13
		<i>cyl + ace</i>	3
		<i>cyl + gel + ace</i>	2
		<i>cyl + ace + efa</i>	1
		<i>ace</i>	1
		<i>esp + gel + ace</i>	1
		<i>cyl + asa1 + asa373 + esp</i>	1
Hamburguesas	<i>E. faecalis</i>	<i>esp + asa1 + asa373 + gel</i>	16
		<i>cyl + ace</i>	10
		<i>esp + efa + cyl</i>	2
Queso de oveja	<i>E. faecium</i>	<i>esp + asa1 + asa373</i>	8
		<i>esp</i>	6
		<i>esp + asa373</i>	1
Queso de vaca	<i>E. faecium</i>	<i>asa1 + asa373 + gel + esp</i>	10
		<i>esp</i>	4
		<i>esp + gel</i>	1
		<i>asa373 + gel + esp</i>	1

gel (gelatinasa), *cyl* (hemolisina), *esp* (adhesina de superficie), *efa* (antígeno de endocarditis), *asa1* y *asa373* (sustancia agregativa), *ace* (antígeno de unión al colágeno).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El alerta en Salud Pública sobre la presencia de los enterococos como patógenos se apoya en la particularidad que tiene este género en transferir de forma horizontal determinantes de resistencia a los ATM de utilización clínica como ampicilina y vancomicina; ambos de elección para el tratamiento

de infecciones por bacterias Gram positivas (Huycke et al.; 1998). En esta investigación en alimentos de origen animal la resistencia a AMP fue 64,8% para el total de los *E. faecium* recuperados y 22,2% para *E. faecalis*. La resistencia a VAN fue detectada en la especie *E. faecium* (42,6%).

Sánchez Valenzuela *et al.* (2009) en España encontraron una importante resistencia antimicrobiana en aislamientos provenientes de alimentos cárnicos y lácteos, datos que son coincidentes con lo hallado en esta investigación.

Marguet *et al.* (2008) analizaron 10 aislamientos de enterococos de quesos ovinos elaborados en la provincia de Chubut (Argentina) y a diferencia de este estudio, no se detectó resistencia a vancomicina y actividad hemolítica; aunque observaron la presencia del gen *gel* como determinante de virulencia.

Es importante destacar que en esta investigación se comprobó que determinantes de virulencia como *cylA* y *gel* no se expresan de forma significativa *in vitro* ($p < 0,05$). Este hecho también fue observado con Hem por Marguet *et al.* (2008). La ausencia de expresión fenotípica de virulencia *in vitro* implica la necesidad de la utilización de herramientas moleculares para su detección.

En esta investigación los determinantes de patogenicidad prevalentes fueron *gel* y *cylA*. Kuhn *et al.* (2003), en un estudio europeo sobre enterococos de diferente origen, comunicaron estos mismos genes de virulencia como los más frecuentes en enterococos recuperados de alimentos de origen animal.

Este trabajo de investigación permitió demostrar la presencia de determinantes de patogenicidad en la mayoría de los aislamientos de *Enterococcus* spp. recuperados de productos cárnicos y lácteos.

Los alimentos de origen animal conforman importantes reservorios de enterococos que contienen determinantes de patogenicidad y que son portadores de resistencia a los ATM de amplia utilización clínica como son AMP y VAN. Es importante destacar la posibilidad de su transmisión al hombre a través de la cadena alimenticia.

ABSTRACT

Enterococci integrate indigenous microbiota from food of animal and vegetable origin. The aim of this investigation was to detect pathogenicity determinants in *Enterococcus* spp. recovered from food of animal origin. Samples col-

lection at downtown and suburban establishments of the city of Tandil, Buenos Aires Province, were randomly performed. Analyzed products were: salami, burgers and semi-hard cow and sheep cheeses. Four series of samples along a one-year period were collected. Characterization was carried out by conventional phenotypic tests and studying the electrophoretic profile of soluble proteins. Virulence factors gelatinase, hemolysin and aggregative substance as well as genetic determinants *gel*, *cyl*, *esp*, *ace*, *asa1*, *asa373*, *efaA* and *esp* were investigated. Intrinsic resistance to vancomycin, b-lactamase production and the minimal inhibitory concentration for ampicillin and vancomycin were determined. 120 isolates were recovered. *E. faecalis* predominated in meat products. *E. faecium* was isolated more frequently in cheeses, *E. avium*, *E. durans* and *E. hirae* in dairy products. Ampicillin resistance was predominant in *E. faecium* (64.8%). The b-lactamase production rate in *E. faecalis* was 3.0%. 42.6% of *E. faecium* were vancomycin-resistant. *E. faecalis* showed the highest expression of virulence factors, mostly gelatinase. Virulence determinants genes were observed in most of the isolates. Virulence determinants encoding hemolysin and gelatinase were significantly detected ($p < 0.05$) in enterococci that did not express those virulence factors. Food of animal origin constitutes a reservoir of potentially pathogenic strains that can be transmitted to humans.

BIBLIOGRAFIA

1. APHA-American Public Health Association. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*, 4th ed. American Public Health Association. 2001. Washington D.C, US.
2. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 20th Informational Supplement. CLSI Document M100-S20. 2010. Wayne, PA. US.
3. Dupré I., Zanetti S., Schito A. M., Fadda G., Sechi, L. A. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J. Med. Microbiol.* 2003; 52: 491–498.
4. Eaton T.J. and Gasson M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67:1628-35.
5. Euzéby P. 2012. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Enterococcus*. Disponible en: www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html
6. Facklam, R.R. and Washington Jr J.A. *Streptococcus* and related catalase-negative Gram positive cocci. In: (Balows, A; Hausler Jr., W.J.; Herrmann, K.L.; Isenberg, H.D and Shadomy, H.J. Eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.: 1991; 238-257. US.

7. Foulquié Moreno M., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 2006; 106: 1-24.
8. Huycke M.M., Sahm D.F, Gilmore M. S. Multiple drug resistant enterococci: the nature of the problem and agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4: 239-249.
9. Jett B.D., Huycke M.M. and Gilmore M.S. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994; 7: 462-478.
10. Kuhn, I., Iversen, A., Burman, L.G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup, F., Seyfarth, A.M., Blanch, A.R., Vilanova, X., Taylor, H., Caplin, J., Moreno, M.A., Dominguez, L., Herrero, I.A., Mollby, R. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment-a European study. *Int. J. Food Microbiol.* 2003; 88: 133-145.
11. Marguet E.R., Vallejo M., Olivera N.L. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioq. Clin. Latinoam.* 2008; 42(4):543-548.
12. Sánchez Valenzuela A., Ben Omar N., Abriouel H., Lucas López R., Ortega E., Martínez Cañamero M., Gálvez A. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem. Toxicol.* 2008; 46: 2648-2652.
13. Sánchez Valenzuela A., Ben Omar N., Pérez Pulido R., Abriouel H., Gálvez, A. Resistencia a antimicrobianos en enterococos aislados de alimentos de origen animal, pescado y mariscos. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.* 2009; 22: 51-62.
14. Sparo M.D., Castro M.S., Andino P.J., Lavigne M.V., Ceriani C., Gutiérrez G.L., Fernández M.M., De Marzi M.C., Malchiodi E.L., Manghi M.A. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate *Enterococcus faecalis*". *J. Appl. Microbiol.* 2006, 100: 123-134.
15. Sparo M.D; Mallo R. Evaluación de la flora bacteriana de un ensilado natural de maíz. *Rev. Argent. Microbiol* 2001; 33(2): 75-80.
16. Sparo M., Nuñez g.G., Castro M., Calcagno m.L., García Allende M.A., Ceci M., Najle R., Manghi M. Characteristics of an environmental strain *Enterococcus faecalis* CECT7121 and its effects as additive on craft dry-fermented sausages *Food Microbiol.* 2008; 25(4): 607-615.
17. Suarez M. Tendencia actual del estreptococo como indicador de contaminación fecal. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* 2002; 40(1): 38-43.

ECOEPIDEMIOLOGY OF FLAVIVIRUS, MONITORING OF THEIR VECTORS (DIPTERA: CULICIDAE) AND HOSTS, IN PAMPA DEL INDIO, PROVINCE OF CHACO.

Stein Marina¹; Oria Griselda I¹, Diaz Luis A², Spinsanti L², Kowalevski Martín³, Huenten D², Pisano B², Beranek M², Aguirre L⁴, Zunino Gabriel³, Stechina Ornella Sofía¹, Deluca Gerardo⁵, Contigiani M², Almirón Walter R⁶

¹Instituto de Medicina Regional-UNNE, Resistencia, Chaco; ² Instituto de Virología "Dr. J.M.Vanella", Facultad de Cs. Médicas, UNC, Córdoba; ³Estación Biológica Corrientes, CONICET, Corrientes; ⁴Hospital "Dante Tardelli". Pampa del Indio, Chaco; ⁵ Facultad de Medicina-UNNE, Corrientes; ⁶Centro de Investigaciones Entomológicas UNC, Córdoba.

INTRODUCCIÓN

El género *Flavivirus*, comprende aproximadamente 68 virus diferentes, la mayoría de los cuales son patógenos para el hombre y son transmitidos por mosquitos.

Para Argentina cobran especial importancia el virus Dengue (DEN), virus de la Fiebre amarilla (FA), virus de la encefalitis St. Louis (ESL) y virus West Nile (WN). En Argentina los primeros casos autóctonos por virus DEN 2, ocurrieron en 1997 en la provincia de Salta. Hacia mediados del 2007 Argentina registraba un total acumulado de 4700 casos, mientras que en la epidemia ocurrida recientemente en el 2009 el número de casos superó los 25.000. Se ha demostrado que muestras reactivas por ELISA para DEN 1, eran infecciones por VSLE, incluso algunas por VWN.

Los ciclos de transmisión del VESL estarían integrados por mosquitos *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. interfor* y palomas torcaza (*Zenaida auriculata*) y torcacita (*Columbina picui*), quienes serían respectivamente los vectores y hospedadores urbanos principales del virus. Estudios serológicos realizados en la Argentina, indican una amplia distribución y endemidad del VESL en las zonas templadas y subtropicales. Entre los años 2001 y 2005, se ha detectado la circulación de los genotipos II, III, V y VII en diferentes especies de mosquitos. Durante el verano-otoño de 2005, en la provincia de Córdoba, se registró por primera vez una epidemia de encefalitis por VESL en humanos. Durante la misma se aislaron cepas correspondientes al genotipo III a partir de mosquitos *Cx. quinquefasciatus*. En el año 2010 se registró un brote

epidémico en humanos en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y en el 2011 en San Juan.

El VWN, de reciente introducción al continente americano, es mantenido en la naturaleza en un ciclo enzoótico ave-mosquito-ave. Los principales vectores son los mosquitos del género *Culex* aunque también se han aislado cepas virales de mosquitos *Aedes* y *Psorophora*. Si bien, los primeros antecedentes de actividad epizootica en Argentina, se remontan al año 2006, con 3 caballos muertos en la provincia de Buenos Aires, datos serológicos indican su introducción hacia el año 2004. Argentina es uno de los pocos países, fuera de los límites de los EEUU, donde se han podido aislar cepas de equinos enfermos. La detección de anticuerpos neutralizantes específicos en caballos residentes en la provincia de Santa Fe indica una elevada actividad conjunta para el VWN y el VSLE. Estos datos junto con los estudios serológicos en aves corroboran la coexistencia de ambos virus en Argentina. El VWN ya circula en varias provincias del norte y centro del país, detectándose infección en aves silvestres en las provincias de Chaco, Córdoba y Tucumán, aunque sin haberse detectado aún en mosquitos. Si bien el ciclo del VWN es aún desconocido en Argentina, como en el resto de América del Sur, estudios experimentales mostraron que las torcacitas podrían mantener el virus en la naturaleza, indicando que junto al VESL podrían compartir similares hospedadores aviares en Argentina.

A diferencia del dengue, la letalidad promedio de la FA es del 20% al 30%, aunque en brotes epidémicos se registran tasas superiores al 80%. Durante los siglos XVIII y XIX ocurrieron las mayores epidemias de América, Europa y oeste de África. En 1871, provocó la muerte de 13.756 personas en la ciudad de Buenos Aires. Además del ciclo urbano, con *Ae. aegypti* como su vector, la enfermedad presenta un ciclo selvático (FAS) donde intervienen especies de monos de los géneros *Alouatta* (mono aullador), *Cebus* (mono capuchino), *Ateles* (mono araña), *Callithrix* (marmoseta) y *Saimiri* (mono ardilla) y mosquitos de los géneros *Haemagogus* y *Sabethes*. Como sus hospedadores principales, el hombre se infecta al ponerse en contacto con los vectores en el ambiente selvático. En América los vectores primarios del virus FAS son las especies *Haemagogus capricornii*, *Hg. equinus*, *Hg. iridiscolor*, *Hg. lucifer*, *Hg. mesodentatus*, *Hg. janthinomys* y *Hg. spegazzini*. También se han encontrado especies como *Hg. leucocelaenus* y *Sabethes chloropterus* infectados en forma natural con este virus. En la Argentina el área favorable para la transmisión selvática de la fiebre amarilla comprende 6 provincias (Chaco incluida) con riesgo variable, debido a la presencia de mosquitos

Haemagogus spp. y de monos de las especies *Alouatta caraya* y *Alouatta guariba*. En nuestro país se produce la reemergencia de FAS en el 2007, con casos humanos y en primates, reportándose el primer caso humano en la Provincia de Misiones. Desde entonces, entre el 2008 y 2009, fueron confirmadas 12 epizootias (11 en la provincia de Misiones y 1 en Corrientes). Si bien se considera erradicada la FA en su forma urbana de nuestro país, siempre queda la posibilidad de nuevos brotes debido a la permanencia del virus en su forma selvática, y la presencia de *Aedes aegypti* en zonas urbanas.

Siendo enfermedades estrechamente ligadas a la distribución de vectores y hospedadores, y estos al ambiente y al clima, el incremento de transmisión se ha adjudicado a la modificación ambiental y aumento del contacto humano-vector-hospedador. En el caso de la FA podemos decir que la principal herramienta de profilaxis es la vacunación, pero en las zonas silvestres esta medida no está garantizada generando la posibilidad de nuevos brotes. El crecimiento demográfico y el desarrollo económico en un medio subtropical como la llanura chaqueña, donde las precipitaciones propician la proliferación de mosquitos, muchos de ellos vectores de arbovirus, supone una interacción huésped- agente etiológico- ambiente, mediada por el vector que es inédita. Atentos a estos hechos es probable que se produzcan fenómenos epidemiológicos y clínicos peculiares que merecen ser observados e interpretados. Su comprensión probablemente contribuirá a mejorar la prevención, detección, atención y el seguimiento de las arbovirosis. Con el objetivo de identificar brechas de investigación o estrategias de Programas de Control, la OPS destacó la necesidad de priorizar la investigación operacional para generar mapas de riesgo regionales. Y así diseñar intervenciones apropiadas de control, vigilancia y modelos predictivos para la prevención de estas enfermedades.

OBJETIVOS

- Identificar *Flavivirus* a partir de mosquitos capturados en El Parque Provincial Pampa del Indio, Chaco.
- Implementar la técnica de RT-PCR con primers genéricos y específicos para la detección y caracterización molecular de *Flavivirus*.
- Detectar *Flavivirus* en primates no humanos de la especie *Alouatta caraya*.
- Detectar la presencia de *Flavivirus* en pacientes asintomáticos y con patologías de tipo febril indiferenciado de la ciudad de Pampa del Indio.

METODOLOGÍA

Entre diciembre de 2009 y diciembre de 2011, se realizaron capturas de mosquitos adultos de manera quincenal entre noviembre y mayo, y mensual entre junio y septiembre, en el Parque Provincial Pampa del Indio. Para las capturas se utilizaron 4 trampas de luz tipo CDC suplementadas con hielo seco, activadas de 9:00 a 17:00 hs y de 18:00 a 8:00 hs. El material capturado fue rotulado y transportado al laboratorio refrigerado en su bolsa colectora. Bajo lupa y sobre platina refrigerada, fueron clasificados por especie en pools de hasta 50 ejemplares mantenidos en recipientes a -70°C . Para la detección molecular de *Flavivirus* de mosquitos se empleó la técnica de RT-Nested PCR con primers genéricos y específicos para detectar el ARN viral. Se puso a punto esta técnica en el Área de Entomología del Instituto de Medicina Regional.

En parajes cercanos a la ciudad se realizó la captura de monos mediante el empleo de dardos Type P, 0.50, con collar de gelatina, red manual y utilización de anestesia general. Una vez anestesiado, el animal fue identificado mediante caravana, registrándose sexo y edad aproximada. El sangrado se realizó mediante punción de la vena tibial y la sangre total se dejó coagular a temperatura ambiente por espacio de 30 minutos. Se transportaron refrigeradas al laboratorio, se centrifugaron a 5000 rpm por 15 minutos para la separación de coágulo y suero. El suero obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Entre diciembre de 2010 y mayo de 2011, se obtuvieron muestras de suero de pacientes que concurrieron al Hospital de Pampa del Indio para otros estudios específicos y que por indicación médica se les requería una muestra sanguínea. De cada paciente se extrajo 5ml de sangre sin anticoagulante, y previo consentimiento, el suero obtenido fue conservado a -20°C para detección de AC contra flavivirus. La detección de anticuerpos se realizó mediante pruebas de Inmunofluorescencia y/o ELISA y para confirmación, la técnica de Neutralización viral, para sueros humanos y de primates no humanos.

RESULTADOS

Un total de 1949 mosquitos pertenecientes a 18 especies fueron analizados para la detección de *Flavivirus*. La especie más abundante fue *Ochle-rotatus scapularis* (380), seguida en orden de abundancia por *Psorophora*

albigena (317), *Oc. hastatus* (201), *Ps. spp.* (173), *Oc. stigmaticus* (167), *Culex* spp. (155), *Ps. cyanescens* (73), *Ps. ferox* (71), *Haemagogus spegazzini* (68), *Ps. discrucians* (58), *Wyeomyia diabolica* (48), *Oc. spp.* (41), *Mansonia titillans* (24), *Cx. chidesteri* (23) y *Oc. albifaciatus* (14). Con menos de 10 ejemplares se identificaron: *Anopheles* spp., *Cx. apicinus*, *Cx. bidens*, *Cx. imitator*, *Cx. maxi*, *Cx. ocosa*, *Ma. spp.* y *Wy. spp.* Se conformaron 98 pooles, de los cuales 10 resultaron positivos por la técnica RT-Nested PCR genérica para *Flavivirus*: 5 de *Culex* spp., 1 *Cx. bidens*, 1 *Mansonia* spp., 1 *Ochlerotatus stigmaticus*, 1 *Oc. scapularis* y 1 *Psorophora* spp. Cinco pooles fueron analizados por la técnica RT-Nested PCR específica para el virus St. Louis, resultando dos de ellos positivos (*Ps. spp.* y *Oc. stigmaticus*).

Ochlerotatus scapularis ha sido hallada infectada con virus St. Louis en la ciudad de Córdoba. Se la señala como una especie que va adquiriendo niveles altos de adaptabilidad al ambiente antrópico y, por otro lado, ha sido implicada como vector del virus Rocío, en Brasil. Stein et al. (2013) capturan esta especie en altos porcentajes sobre cebo humano en la provincia de Chaco y se ha indicado para la especie una amplia variedad de hospedadores.

Culex bidens, es capturada principalmente sobre operador, en estudios con diferentes cebos, pero varios autores la clasifican como una especie con tendencia a picar aves. Esta especie puede hallarse tanto en ambientes silvestres como urbanos, siendo colectada tanto de hábitats naturales como artificiales. *Culex bidens* no ha sido hallada previamente infectada en nuestro país, por lo que este representaría el primer reporte de infección.

Ochlerotatus stigmaticus es una especie de ambientes silvestres. De la misma no se conocen los estados inmaduros y muy poco se sabe sobre el comportamiento de los adultos. En este estudio aparece como una especie muy abundante en el área de estudio y a partir de los resultados se confirma el primer hallazgo de infección para *Oc. stigmaticus* en nuestro país.

Se capturaron 6 ejemplares de *Alouatta caraya* (3 machos y 3 hembras). Pampa del Indio está ubicada en lo que se considera zona límite de distribución de la especie, por lo que la presencia de este primate no humano no es muy común. De allí las pocas tropas localizadas y los pocos monos capturados. Todos los sueros resultaron negativos para flavivirus genéricos.

Se obtuvieron 308 muestras de suero de personas con edades comprendidas entre 15-88 años. Se analizaron 124 sueros y se detectaron anticuerpos totales por la técnica de Neutralización (AcsNT) en células VERO, resultando 28 sueros positivos para flavivirus (19 mujeres y 9 varones). Los AcsNT detectados fueron: 40% para VESL y 4.8% VWN. Dos individuos presentaron anticuerpos para VESL y VWN. Para VWN existen registros serológicos en aves desde el año 2004 y casos clínicos desde el año 2006 en la provincia de Chaco. Con respecto al VESL es bien conocida su elevada actividad en Resistencia (30%). La presencia de individuos con anticuerpos para ambos virus podría tratarse de infecciones secuenciales o cruces serológicos que ocurren en lugares donde circula más de un flavivirus.

Estos resultados aportan al conocimiento de la actividad de estos virus en la provincia del Chaco, los cuales deben considerarse en el momento de hacer un diagnóstico correcto por su similitud en la presentación clínica y características antigénicas.

Así mismo, es necesaria la implementación de programas de vigilancia para estos virus, a fin de realizar detección precoz de posibles brotes de enfermedades febriles, mediante un diagnóstico diferencial con otros arbovirus, y evaluar su impacto en la salud pública.

ABSTRACT

To survey and identify activity of *Flavivirus*, mosquitoes (Culicidae) and monkeys (*Alouata caraya*) were captured, between december 2009 and december 2011, in Pampa del Indio, province of Chaco. With the same objective human sera were obtained from patients who attended to hospital of Pampa del Indio city. Seroprevalence studies for St. Louis encephalitis viruses (SLEV) and West Nile viruses (WNV) were conducted in humans and monkeys. Also a total of 1949 mosquitoes (98 pools) belonging to 18 species were analyzed for *Flavivirus* detection. Ten pools were positive for *Flavivirus*: 5 *Culex* spp., 1 *Cx. bidens*, 1 *Mansonia* spp., 1 *Ochlerotatus stigmaticus*, 1 *Oc. scapularis* and 1 *Psorophora* spp. Five pools were analyzed by RT-Nested PCR technique specific to SLEV, resulting positive two of them (*Ps. spp.*, and *Oc. stigmaticus*). Since this is the first report of infection for *Cx. bidens* and *Oc. stigmaticus* in Argentina. None of the monkeys sera⁶ were positive for *flavivirus*. A total of 124 human sera were analyzed by NTab by plaque reduction neutralization test, using Vero cells. Twenty eight were positive: 40% for SLEV

and 4.8% for WNV. Two individuals had antibodies to both viruses (SLEV and WNV). This could be due to sequential infection or serologic crossings, more than one flavivirus circulating in this study area. These results contribute to the knowledge of the activity of these viruses in the province of Chaco and alert about the necessary implementation of monitoring programs for these viruses. Differential diagnosis should also be considered, because these arboviruses have similarity in clinical presentation and antigenic characteristics, in order to make possible early detection of febrile disease outbreaks and assess their impact on public health.

BÚSQUEDA DE *HISTOPLASMA CAPSULATUM* EN POBLACIONES DE ROEDORES Y MURCIÉLAGOS EN LA CIUDAD DE BUENOS AIRES, ARGENTINA

Olga Virginia Suárez¹, Cristina Elena Canteros², Roberto Osvaldo Suárez-Alvarez^{1,2}, Adriana Toranzo², Manuel Agra¹, Héctor Damián Salas²

¹Laboratorio de Ecología de Poblaciones. Grupo de Investigación en Ecología de Roedores Urbanos. Departamento de Ecología, Genética y Evolución. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. ²Departamento Micología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas.

ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

INTRODUCCIÓN

Histoplasma capsulatum, es un hongo patógeno causante de la histoplasmosis en humanos y en la mayoría de los mamíferos. Su fase saprofítica-micelial se desarrolla asociada a guano de aves y de murciélagos. La infección se adquiere por la inhalación de conidios y fragmentos de hifas que penetran en los tejidos del hospedero susceptible donde inician el cambio a la fase parasitaria-levaduriforme. La histoplasmosis ocupa el cuarto lugar en frecuencia entre las micosis profundas diagnosticadas en Argentina. Históricamente, la infección se asociaba con la población rural, sin embargo, actualmente se observan casos en pacientes con diferentes causas de inmunosupresión, sin antecedentes de haber vivido o visitado zonas rurales.

La constante modificación del ambiente como consecuencia del proceso de urbanización, genera condiciones óptimas para la proliferación de plagas como roedores y quirópteros. Las especies de roedores sinantrópicos mas frecuentes en esta ciudad son *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus* (Cavia *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2007) y la de murciélagos es *Tadarida brasiliensis* (Vaccaro & Varela, 2001). La ausencia de predadores naturales que controlen el crecimiento de las poblaciones presas, así como la dependencia de estas especies por el hombre ya sea para la obtención de alimento y/o refugio, incrementa el riesgo potencial de transmisión de enfermedades infecciosas.

En general, todas las especies de murciélagos son considerados como potenciales reservorios y diseminadores de *H. capsulatum* en la naturaleza, en la ciudad de Buenos Aires, existe sólo un estudio donde se abordó

la búsqueda de éste patógeno en murciélagos (Canteros *et al.*, 2005). En tanto, en roedores se desconoce el rol que poseen como reservorios y dispersores de *H. capsulatum* y solo existen unos pocos reportes de infección natural en especies salvajes de la familia Rodentia (Naiff *et al.*, 1996).

Actualmente, además de métodos tradicionales como el cultivo, se pueden aplicar métodos moleculares como la PCR anidada que permite detectar la presencia de ADN específico de *H. capsulatum* en muestras de tejido. Esta técnica fue exitosamente probada en humanos (Maubon *et al.*, 2007; Toranzo *et al.*, 2009) y en animales (Taylor *et al.*, 2012).

El objetivo de este estudio fue reconocer las implicancias sanitarias de los mamíferos silvestres que habitan en nichos urbanos como reservorios y dispersores de *H. capsulatum* a través de la búsqueda de infección por este hongo en especies de roedores y murciélagos de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de roedores y murciélagos

Las capturas de roedores se realizaron en villas de emergencia y espacios verdes (parques y reservas naturales) mediante trampas de captura viva siguiendo las normas internacionales de captura y manejo de especies animales. En los espacios verdes las trampas se instalaron en transectas colocando cada 5 metros una trampa tipo jaula para la captura de especies del género *Rattus* y una trampa tipo Sherman para roedores silvestres y comensales del género *Mus*. En las villas de emergencia se colocó una trampa de cada tipo por vivienda. Las trampas funcionaron durante 4 noches consecutivas y fueron revisadas diariamente por la mañana.

Los murciélagos fueron capturados vivos utilizando redes especiales de colonias localizadas en unidades habitacionales y edificios públicos. También se incluyeron en el estudio muestras extraídas de ejemplares muertos provistas por el Departamento de Zoonosis del Ministerio de Salud "Instituto Pasteur", previa serología negativa para el virus de la rabia.

Identificación de especies de animales capturados

Los animales fueron previamente anestesiados y en esta condición, se registraron sus datos morfométricos, peso, sexo y estado reproductivo. Para

roedores, se registró el largo total, el largo de la cola, del tarso y de la oreja, con el fin de confirmar la determinación específica.

Los murciélagos fueron identificados en función de sus datos fenotípicos y morfométricos. Para estos mamíferos se registró la longitud del antebrazo, del 1ro y 5to dedo, de la tibia y del pie. Sólo se trabajó con murciélagos machos adultos, una vez recuperados de la anestesia, las hembras y juveniles fueron liberados a fin de no alterar la dinámica poblacional de este grupo.

Obtención de muestras para estudios microbiológicos y moleculares

Los animales aún anestesiados, fueron sacrificados por dislocación cervical. Bajo estrictas normas de bioseguridad y en forma aséptica se extrajeron muestras de bazo e hígado. Las muestras fueron colocadas con solución fisiológica estéril en tubos Eppendorf debidamente rotulados con el número de ejemplar, fecha y lugar de captura, posteriormente, conservadas a -20°C hasta ser procesadas para estudios microbiológicos y moleculares.

Estudios microbiológicos

Un pequeño fragmento de cada órgano fue cultivado en agar Sabouraud adicionado con cloranfenicol (250 mg/L) y cicloheximida (400 mg/L) e incubado a 28°C. Los cultivos fueron observados semanalmente hasta la aparición de colonias filamentosas sugestivas de *H. capsulatum*. Los tubos sin crecimiento colonial a los 40 días de incubación y/o con desarrollo de hongos contaminantes, fueron descartados. Estos procedimientos se realizaron en estrictas condiciones de bioseguridad.

Estudios moleculares

Muestras de 10 y 50 mg de bazo e hígado, respectivamente, fueron procesadas utilizando el equipo DNA tissue Kit (Qiagen) para extraer ADN del tejido. Posteriormente, se utilizó una técnica de PCR anidada que amplifica una porción específica del gen *HcP100* involucrado en la infección por *H. capsulatum*, descrita por Bialek *et al.*, en 2002 y estandarizada a las condiciones de nuestro laboratorio (Toranzo *et al.*, 2009). Las bandas amplificadas fueron secuenciadas para confirmar la identificación.

Análisis de resultados

Se estimó el porcentaje de ejemplares de cada grupo de mamíferos que resultaron positivos a la presencia de *H. capsulatum* mediante análisis molecular.

Resultados y discusión

Se capturaron un total de 50 roedores (sinantrópicos y silvestres) (Tabla 1) y 48 murciélagos (todos de la especie *T. brasiliensis*) en diferentes zonas de la ciudad, 24 murciélagos hembras y/o machos jóvenes fueron puestos en libertad según lo antedicho. Los lugares de captura están señalados en la Figura 1.

Histoplasma capsulatum no pudo ser recuperado en cultivo de bazo e hígado de los animales analizados. Si bien el aislamiento en cultivo es el “gold standard” para demostrar histoplasmosis, este método posee como limitación la baja sensibilidad debido a que se necesita una carga fúngica importante y viable en el tejido infectado para obtener desarrollo del hongo.

Actualmente, se reconoce que la PCR anidada, que amplifica una porción específica del gen *HcP100* es una herramienta significativamente sensible y específica para detectar la infección por *H. capsulatum* en tejidos (Maubon *et al.*, 2007; Toranzo *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2012). Ésta PCR fue capaz de detectar ADN de *H. capsulatum* en hígado y/o bazo del 32% de la población total de roedores estudiada (n: 50) (tabla 1) y del 42% (n: 24) de la población de murciélagos (Tabla 2). En nuestro trabajo se consideró el bazo y el hígado como órganos de estudio, y se excluyó el pulmón, con el fin de evitar reacciones cruzadas. Estas reacciones cruzadas pueden ocurrir debido a que un alto porcentaje de roedores, entre los que figuran *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, pueden estar infectados por un hongo ambiental del género *Emmonsia* (Hubálek Z, 1998; Hubálek *et al.*, 1999; 2005), que presenta una estrecha relación filogenética con *H. capsulatum*, lo que impide diferenciar ambas especies sin realizar una secuenciación (Gaur & Lichtwardt, 1980; Beguin *et al.*, 2005). Sin embargo, *Emmonsia* sp. posee una localización pulmonar exclusiva y es incapaz de producir en roedores una infección generalizada como lo hace *H. capsulatum*.

En 6 animales (3 roedores y 3 murciélagos) solo fue posible procesar por técnicas moleculares un órgano. En otros 9 animales (3 roedores y 6 murciélagos) pudo detectarse ADN fúngico únicamente en uno de sus órganos analizados. En 7 de éstos 9 animales, el bazo fue PCR-positivo para *H. capsulatum*, pero no su hígado. En los otros dos animales, el hígado fue PCR-positivo y el bazo negativo. Esto puede deberse a la distribución diferencial del hongo en el órgano infectado. Apoya esta hipótesis el hecho de

que el hígado fue el órgano con más falsos negativos y posiblemente esto se relacione con que la porción que se procesa para biología molecular es muy pequeña (≤ 50 mg) y la posibilidad de que esta porción represente una muestra homogénea del órgano es azarosa. Otra posibilidad, es que este evento esté relacionado al mecanismo de infección e invasión de *H. capsulatum* que involucra una diseminación vía linfática o hemática, la linfática puede funcionar como una ruta alterna a la hemática y ambas puede darse en tiempos diferentes dependiendo del tamaño del inóculo, del estado inmunológico del hospedero, entre otros factores, y en consecuencia es posible que en un momento determinado uno de los órganos esté invadido y otro no.

Finalmente, la comparación de los fragmentos amplificados por PCR anidada con secuencias depositadas en el GenBank, confirmó que el ADN amplificado correspondía a *H. capsulatum*.

Los resultados mostraron que *M. musculus* es entre las especies de roedores sinantrópicos la especie más susceptible a la infección por *H. capsulatum*. En humanos no hay datos que permitan conocer el grado de exposición a *H. capsulatum*, no obstante se calcula que entre un 30 y un 35% de la población que habita la región geográfica llamada llanura del Río de la Plata, (donde se ubica la ciudad de Buenos Aires), está infectada con *H. capsulatum*. *M. musculus* vive estrechamente relacionado con el hombre y en general posee poca movilidad cuando la disponibilidad es alta de recursos (entre 4 y 20 metros lineales). Estas características nos permiten especular que, si el 43% (13/30) de estos animales están expuestos a *H. capsulatum*, probablemente los humanos residentes de estas áreas poseen el mismo nivel de exposición al hongo, lo que coincide con los cálculos teóricos de infección en humanos.

Cabe señalar que el 100% de los roedores infectados fueron capturados en los llamados espacios verdes de la Ciudad, áreas vegetadas con una superficie superior a 70 has. esto está relacionado a la naturaleza geófila del hongo, que vive asociado a tierra fértil y abonada generalmente con guano de aves y/o murciélagos.

Los murciélagos fueron colectados en edificios y unidades habitacionales. Hasta el presente la captura en espacios verdes de estos animales ha sido imposible por diversas razones siendo el comportamiento en el vuelo (altura de vuelo) y condiciones climáticas las más importantes. Coincidentemente con lo expuesto en el caso de roedores, el 42% de los murciélagos también mostró estar infectado con *H. capsulatum*.

De acuerdo con los resultados obtenidos los roedores *M. musculus* y *O. flavescens* así como el murciélago migratorio *T. brasiliensis*, podrían ser considerados como reservorios e indicadores de infección por *H. capsulatum* en las zonas urbanas, por lo que proponemos continuar estudiando el papel que estos animales representan en la ecología de la histoplasmosis.

Si bien la infección por *H. capsulatum* en humanos, así como en otros mamíferos, no significa necesariamente que desarrollarán la enfermedad, conocer los porcentajes de infección es importante desde el punto de vista sanitario para poder implementar políticas de salud y de prevención en aquellos pacientes que son más susceptibles a desarrollar histoplasmosis progresiva, como son los inmunosuprimidos graves.

Tabla 1. Especies de roedores procesados, sitio geográfico de la captura y resultado de los estudios moleculares

Especies	n	Relación Hembra/Macho	Sitio geográfico de captura (n)	Detección de ADN de <i>H. capsulatum</i> en al menos un órgano por PCR
<i>Mus musculus</i>	30	23/7	Facultad de Agronomía (22)	10
			Parque de la Ciudad ⁷	3
			Villa 26 del Riachuelo ¹	0
<i>Rattus norvegicus</i>	18	8/10	Autódromo Municipal ²	0
			Parque de la Ciudad ¹	0
			Parque Indo americano ¹³	1
			Villa N° 26 del Riachuelo ²	0
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	2	0/2	Parque de la Ciudad ¹	1
			Autódromo Municipal ¹	1
Total procesados	50			16

Tabla 2. Especies de murciélagos procesados, sitio geográfico de la captura y resultado de los estudios moleculares

Especies	n	Relación Hembra/Macho	Sitio geográfico de captura (n)	Detección de ADN de <i>H. capsulatum</i> en al menos un órgano por PCR
<i>T. brasiliensis</i>	24	0/24	Edificio vivienda Barrio La Boca ⁴	1
			Parque de la Ciudad ¹	1
			Edificio de la Facultad de Ingeniería ⁵	4
			Edificio del Ministerio de trabajo (14) [†]	4
Total procesados	24			10

† Estas muestras fueron de murciélagos encontrados sin vida y gentilmente cedidas por el Instituto de Zoonosis Pasteur de la Ciudad de Buenos Aires

ABSTRACT

In order to know the implication of bats or rodents in the ecology of *Histoplasma capsulatum*, agent of the histoplasmosis, in Buenos Aires city, Argentina we explored *H. capsulatum* infection in this wild animals associated to urban niches.

We captured 50 rodents and 48 bats in different areas of the city. In accordance with the international rules of capture and management of bat species, 24 females and young males were released. All animals were identified based on their external morphological features. All animals were sacrificed by cervical dislocation and samples of spleen and liver were removed aseptically. Each organ specimens were processed for the *H. capsulatum* detection by microbiological and molecular studies (nested-PCR targeting a fragment of *Hcp100* gene). *Histoplasma capsulatum* could not be recovered from culturing of any animal organs. Nested-PCR detected *H. capsulatum* DNA in 13/30 *Mus musculus*; 1/18 *Rattus norvegicus*; 2/2 *Oligoryzomys flavescens*, and 10/24 bats (all identified as *Tadarida brasiliensis*) The fragment of *Hcp100* gene was sequenced and compared with sequences deposited in the Genbank, which confirmed

DNA of *H. capsulatum* in animal tissues. The results showed that *M. musculus*, *O. flavescens* and *T. brasiliensis* are more susceptible than *R. norvegicus* to *H. capsulatum* infection in Buenos Aires City. Similar to bats, the urban rodents could be included as reservoirs of *H. capsulatum* in cities.



Figura 1. Mapa de la Ciudad de Buenos Aires con la ubicación de los sitios de captura.

Número de ejemplares con PCR (+) para *H. capsulatum*/número de ejemplares capturados

roedores murciélagos.

Se excluyeron los murciélagos liberados

BIBLIOGRAFIA

1. Beguin H, Larcher G, Nolard N, Chabasse D. *Chrysosporium chiropterorum* sp. nov., isolated in France, resembling *Chrysosporium* state of *Ajellomyces capsulatus* (*Histoplasma capsulatum*). *Med Mycol* 2005; 43(2):161-9.
2. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling, Robertson V, Knobloch J, Hohle R. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1644–1647.
3. Canteros CE, Iachini RH, Rivas MC, Vaccaro O, Madariaga J, Galarza R, Snaiderman L, Martínez M, Paladino M, Cicuttin G, Varela E, Alcoba E, Zuiani F, Sahaza JH, Taylor ML, Davel G. Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis*. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37(1): 46-56.
4. Cavia R, Andrade A, Zamero ME, Fernández MS, Muschetto E, Cueto GR, Suárez OV. Hair structure of small rodents from central Argentina: A tool for species identification. *Mammalia* 2008; 72(1):35-43.
5. Fernández MS, Cavia R, Cueto GR, Suárez OV. Implementation and evaluation of an integrated program for rodent control in a shanty town of Buenos Aires city, Argentina. *EcoHealth* 2007; 4:271-277.
6. Gaur PK & Lichtwardt RW. Comparative study of a new *Chrysosporium* species with *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia* 1980; 18(2):105-14.
7. Hubálek Z, Burda H, Scharff A, Heth G, Nevo E, Sumnera R, Pesko J, Zima J. Emmonsiosis of subterranean rodents (Bathyergidae, Spalacidae) in Africa and Israel. *Med Mycol.* 2005; 43(8):691-7.
8. Hubálek Z, Nesvadbová J, Halouzka J. Emmonsiosis of rodents in an agroecosystem. *Med Mycol.* 1998; 36(6):387-90.
9. Hubálek Z. Emmonsiosis of wild rodents and insectivores in Czechland. *J Wildl Dis.* 1999; 35(2):243-9.
10. Maubon D, Simon S, Aznar C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58: 441–444.
11. Naiff RD, Barrett TV, Naiff Mde F, Ferreira LC, Arias JR. New records of *Histoplasma capsulatum* from wild animals in the Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1996; 38(4):273-7.
12. Taylor ML, Hernández-García L, Estrada-Bárceñas D, Salas-Lizana R, Zancopé-Oliveira RM, García de la Cruz S, Galvão-Dias MA, Curiel-Quesada E, Canteros CE, Bojórquez-Torres G, Bogard-Fuentes CA, Zamora-Tehozol E. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats randomly captured in Mexico, Brazil, and Argentina, using the polymorphism of (GA)(n) microsatellite and its flanking regions. *Fungal Biol.* 2012; 116:308-17.
13. Toranzo AI, Tiraboschi IN, Fernández N, Ibarra-Camou B, Rivas MC, Lee W, Davel G, Canteros CE. Diagnóstico molecular de histoplasmosis humana en muestras de sangre entera. *Rev Argent Microbiol.* 2009; 41:20-6
14. Vaccaro OB & Varela EA. Quirópteros de la ciudad de Buenos Aires y de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev Mus Argent Cienc Nat* 2001; 3(2): 181

DINÁMICA DE FLEBOTOMÍNOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) POTENCIALES VECTORES DE LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA Y VISCERAL EN EL CHACO HÚMEDO, CHACO, ARGENTINA.

Szelag Enrique Alejandro¹, Oscar Daniel Salomon², Juan Ramón Rosa¹

¹Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste. ²Instituto Nacional de Medicina Tropical.

INTRODUCCIÓN

Las Leishmaniasis son enfermedades Zoonótica parasitarias, con manifestaciones tegumentarias o visceral. Son producidas por un protozoario del genero *Leishmania* de localización intracelular obligado en macrófagos, y transmitidas por la picadura de la hembra de un díptero hematófago *Phlebotominae*.

Mundialmente distribuida, esta enfermedad fue descripta en 88 países comprendidos en las áreas de climas tropicales y sub-tropicales, constituyendo un serio problema para la salud pública en mucho de los países con transmisión activa.

En Argentina la Leishmaniasis Tegumentaria (LT) es endémica en 9 provincias de las Regiones del NOA, NEA y Chaco (Húmedo y Seco) presentó 40 a 90 casos/año país hasta la década del 80. Desde entonces se presentan brotes epidémicos con hasta 1400 casos/año cada vez más frecuentes, intensos y dispersos. El reservorio de la LT en la Argentina no está identificado.

La Leishmaniasis Visceral (LV) urbana, luego de su aparición en Mato Grosso do Sul (Brasil) y Asunción (Paraguay), con reservorio en el perro, produjo el primer caso humano autóctono en la Argentina en la ciudad de Posadas en el año 2006. Actualmente se registra transmisión en Misiones, Corrientes, Santiago del Estero y Formosa con 103 casos humanos acumulados a 2012, 8 óbitos, miles de casos caninos, y un vector con amplia tolerancia térmica que se dispersa hacia el sur (Gould 2013).

Siendo enfermedades estrechamente ligadas a la distribución de vectores y reservorios, y estos al medio y al clima, el incremento de transmisión se ha adjudicado a la modificación ambiental y aumento de contacto Humano-Vector-Reservorio, como los producidos por la deforestación, la urbanización desordenada, las migraciones y las obras de infraestructura sin evaluación sanitaria previa.

Se destaca a la provincia de Chaco como el área de mayor vulnerabilidad de instalación de LV y vía de dispersión hacia el Oeste y Sur, sumada a la ya conocida LT desde la década del 50, es el objetivo del presente trabajo, caracterizar la distribución en tiempo y espacio de vectores potenciales de LT y LV orientado a proponer medidas de prevención y control.

MATERIALES Y MÉTODOS

La provincia del Chaco ubicada al Noreste de Argentina, se sitúa entre los 24 y 28° latitud sur y entre 58° 30' y 63° 20' longitud Oeste con una superficie de 99.633 Km² y dividida en las regiones Biogeográficas de Chaco Occidental (Chaco Seco) con características xerofíticas, y en Chaco Oriental (Chaco húmedo) con régimen pluviométrico atlántico. Se seleccionaron tres sitios de estudio urbano-rurales: Monte Alto (Resistencia) – LT endémo-epidémica, Margarita Belén - con antecedentes humanos de LT y Colonia Benítez – sin investigación previa. En cada área de estudio se seleccionó una vivienda habitada donde se instalaron mensualmente durante una noche, trampas de luz tipo CDC de 12 hs de permanencia (19 a 7hs), en Domicilio (interior o galería de la vivienda), Peridomicilio (corrales o sitios de reposo de animales, próximos a la vivienda) y Extradomicilio (Parches de bosques, a no menos de 150 mts. de la vivienda) durante el período octubre 2010 – septiembre 2012. Se registraron datos de Humedad Relativa, Temperatura Máxima y Mínima, intracaptura (termo higrómetro digital – Hygrotherm®) con el fin de correlacionar la abundancia de Phlebotominae y variables climáticas

La determinación de la infección natural por flagelados del género *Leishmania*, se realizó por disección y observación al microscopio óptico (del aparato digestivo para la determinación primaria en sub-género).

Los Phlebotominae capturados en cada trampa fueron conservados en alcohol 70° por al menos 48hs para luego ser sometidos al proceso de clarificación y montaje. Las determinaciones de especie se realizaron bajo microscopio según claves dicotómicas (Gallati 2003). Dada la conocida simpatria de *Ev. cortelezzii* y *Ev. sallesi* en la región, y la imposibilidad de diferenciación de hembras de dichas especies mediante caracteres morfológicos, se cita a las mismas como *Evandromyia* complejo *cortelezzii*.

La composición de la fauna flebotomínica fue evaluada mediante la aplicación del índice de abundancia Shannon-Wiener y equidad de Pielou. La variación de especies por ectopo fue evaluada mediante la prueba de χ^2 .

La dinámica de *Phlebotominae* se interpretó como la fluctuación estacional durante los meses del año. La correlación de abundancia de especies y variables climáticas, fue realizada en base al índice de Sperman.

RESULTADOS

Durante el período octubre 2010 a septiembre 2012, se capturaron en total 1499 *Phlebotominae* en los sitios estudiados, de los cuales 60.6% fueron machos y 39.4% hembras. Se registraron 9 especies: *Brumptomyia brumpti*, *Brumptomyia avellari*, *Evandromyia cortelezzii*, *Evandromyia sallesi*, *Evandromyia evandroi*, *Migonemyia migonei*, *Sciopemyia sordelli*, *Nyssomyia neivai*, *Psathyromyia shannoni*.

Las especies predominantes fueron *Mg. migonei* (41.03%) seguido de *Ny. neivai* (38.96%) y *Ev. Complejo cortelezzii* (9.54%). Esta última representada por hembras de *Ev. cortelezzii* y *Ev. sallesi* (6.47%), machos de *Ev. cortelezzii* (1.47%) y *Ev. sallesi* (1.60%). La mayor abundancia de *Phlebotominae* (n=697) y riqueza específica se observó en Margarita Belén (S=8), que a su vez mostró la menor diversidad ($H=1.17$) y equidad ($J=0.51$), siendo el sitio más diverso Colonia Benítez ($H=1.58$) (TABLA I).

La distribución por ecotopos mostró diferencias significativas en todas las especies estudiadas (tabla II). La mayor abundancia de *Phlebotominae* se registró en el Extradomicilio, seguido del Peridomicilio e Intradomicilio. No se observan diferencias significativas entre *Ny. neivai* y *Mg. migonei* en su distribución por ecotopos. ($\chi^2 = 1.601$; $p = 0.449$; $GI = 2$).

La variación estacional de los *Phlebotominae*, mostró una mayor abundancia en verano y primavera, seguido por otoño e invierno (Tabla II). *Mg. migonei* predominó en verano con un promedio temperatura de 28.09°C y humedad relativa de 61%, mientras que en primavera la especie con mayor frecuencia fue *Ny. neivai* (Figura 2) con promedios de 22.5°C y 58%HR. La menor abundancia de *Phlebotominae* se registra en los meses de junio y julio.

El índice de correlación de Sperman muestra para *Mg. migonei* y *Ny. neivai*, una mayor correlación, con el promedio de temperatura intracaptura: $rs = 0.69$ y $rs = 0.77$; y una débil correlación negativa con la humedad relativa máxima: $rs = -0.18$ y $rs = -0.19$ respectivamente.

Se realizaron 62 disecciones de *Phlebotominae* provenientes de los sitios estudiados. No se observaron parásitos intra-intestinales (tabla IV).

Figura 1: Imagen satelital marcando los puntos de estudio. Imágenes tomadas del Google Earth, versión 4.0.2416 (beta) <http://earth.google.es>

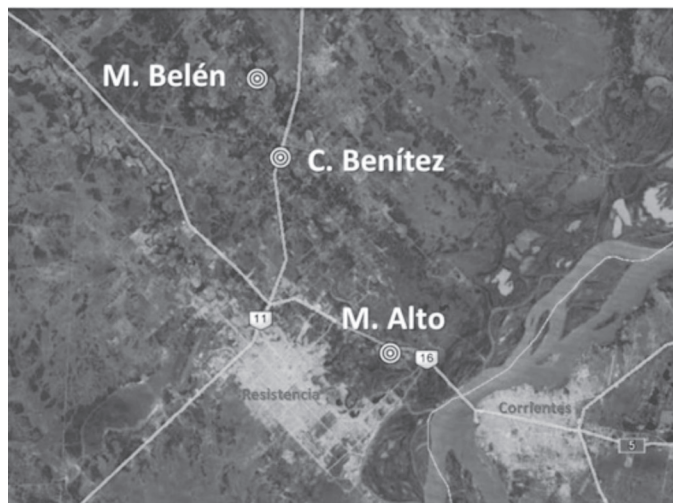


Tabla I: Distribución de especies, índices de diversidad y equidad, por sitio de captura y ecotopo. Período octubre2010–septiembre2012. Chaco Argentina

ESPECIE	Margarita Belén			Colonia Benítez			Monte Alto			Total
	INT	PER	EXT	INT	PER	EXT	INT	PER	EXT	
<i>Mg. migonei</i> *	5	80	215	2	16	38	19	81	159	615
<i>Ny. neivai</i> *	9	118	183	5	29	9	17	33	181	584
Ev. Comp. cortellezzii*	2	6	27	4	20	24	7	33	20	143
<i>Pa. shannoni</i> *	0	0	36	0	3	1	0	1	0	41
<i>B. brumpti</i> *	1	0	10	0	0	1	0	0	94	106
<i>Sc. sordelli</i> **	0	1	1	0	1	4	0	0	0	7
<i>Ev. evandroi</i> **	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>B. avellari</i> **	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Total	19	206	472	11	69	77	43	148	454	1499
S	8			6			5			
H	1.17			1.58			1.32			
J	0.51			0.76			0.68			

Int: Intradomicilio, Per: Peridomicilio, Ext: Extradomicilio, S: Riqueza específica, H: Índice de Shannon- Wiener, J: Índice de equidad de Pielou. *X² con diferencias significativas; **No calculado por baja frecuencia

Tabla II. Variación estacional del *Phlebotominae*, Octubre2010-Septiembre2012, Chaco, Argentina

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
<i>Mg. migonei</i>	105	361	121	28
<i>Ny. neivai</i>	170	297	100	17
<i>Ev. Comp. cortellezzii</i>	19	44	74	6
<i>Pa. shannoni</i>	0	33	6	2
<i>B. brumpti</i>	98	6	1	1
<i>Sc. sordelli</i>	0	2	5	0
<i>Ev. evandroi</i>	0	1	0	0
<i>B. avellari</i>	0	0	2	0
Total	392	744	309	54

Tabla III: Disección de *Phlebotominae*, por sitio de estudio y especie.

Especie	Margarita Belén	Colonia Benítez	Monte Alto
<i>Mg. migonei</i>	8	2	23
<i>Ny. neivai</i>	0	4	8
<i>Ev. comp. cortellezzii</i>	6	3	8
Total	14	9	39

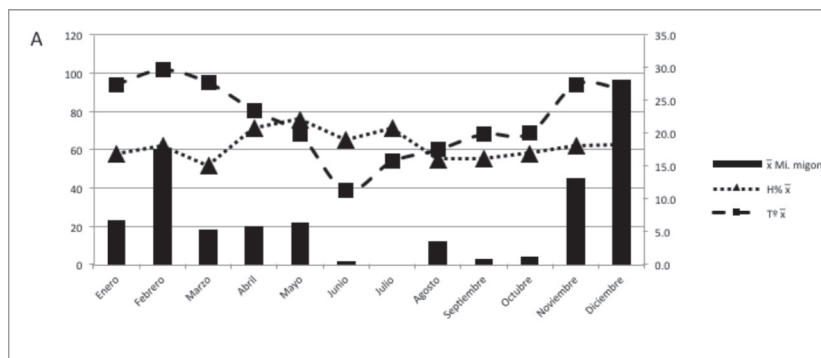
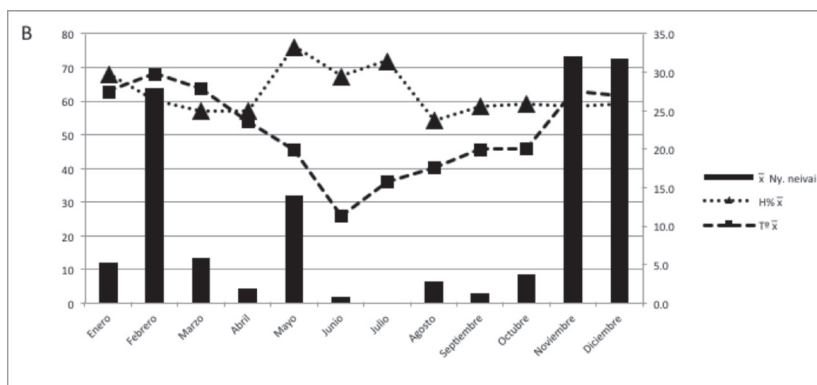
Figura 2A: Promedio mensual de *Phlebotominae* capturados, Temperatura y Humedad Relativa. Octubre 2010-septiembre2012. Variación *Mg. migonei*

Figura 2B: Promedio mensual de Phlebotominae capturados, Temperatura y Humedad Relativa. Octubre 2010-septiembre2012. Variación *Ny. neivai*.



CONCLUSIÓN

La distribución asociada de *Ny. neivai* y *Mg. migonei* observó anteriormente en la Bio-Región Chaqueña, postulándose dos patrones de diversidad para la región¹ *Mg. migonei* como especie prevalente con o sin presencia de *Ny. neivai*, en la región del Chaco Seco(2) *Ny. neivai* altamente abundante con escaso *Mg. migonei* en la región del Chaco húmedo. Pudiendo existir resultados intermedios en zonas húmedas periurbanas modificadas (Salomón 2008).

Los resultados aquí obtenidos soportan la hipótesis de un tercer tipo de distribución, relacionada a zonas rurales–periurbanas, asociadas a parches de bosque con alto grado de antropización, donde la razón *Ny. neivai* / *Mg. migonei* es de 1.1.

Ny. neivai, la especie de mayor distribución en Argentina, fue hallada naturalmente infectada con *Leishmania sp.* en la provincia de Tucumán (Córdoba Lanús 2006) e incriminada como responsable de la transmisión epidémica en ambientes modificados peridomésticos en la Argentina, Brasil y Paraguay. *Mg. migonei* considerada como el vector de LT capaz de mantener la circulación zoonótica del parásito en períodos inter-epidémicos y eventualmente generar casos humanos aislados (Salomón 2006), es conocida también en Argentina como vector putativo de LV (Salomón 2010). El comple-

jo *Ev. cortelezii*, fue incriminado como probable vector de LC en Argentina debido a su alta abundancia en brotes esporádicos de LC y por haber sido hallado naturalmente infectado con *L. braziliensis* en la región Chaqueña occidental (Rosa 2011).

Si bien la mayor abundancia relativa y riqueza específica se registró en Margarita Belén, éste sitio mostró la menor diversidad, debido a la alta predominancia de *Ny. neivai* y *Mg. migonei* sobre las demás especies, mostrando el más bajo índice de equidad ($J=0.51$). Su predominancia podría estar asociada al grado de modificación del ambiente lo que explicaría los valores similares en el sitio Monte Alto (con igual grado de modificación del bosque que Margarita Belén), y la mayor diversidad en Colonia Benítez por tratarse de un sitio con un bajo grado de antropización. La predominancia de estas especies en ecotopos altamente modificados ya fue observada en la región del Yungas en la Provincia de Tucumán y en el estado de Paraná Brasil, donde se observó la mayor abundancia relativa de *Ny. neivai* sobre *Mg. migonei* en el intradomicilio, probablemente debido a su hábito antropofílico y su mejor adaptación a los ambientes modificados (Córdoba Lanús 2002, **Fordellon**2012).

A diferencia de estudios realizados en el norte del país, donde los picos de abundancia de *Ny. neivai* se observan en primavera y otoño (Córdoba Lanús 2002), el presente estudio mostró una distribución bimodal, con mayor abundancia en verano y primavera, siendo el invierno la estación con menor abundancia relativa. Igual variación fue observada para *Mg. migonei*. Ambas especies se mostraron afectadas por la temperatura, con una mayor correlación con la temperatura promedio Intra captura. Si bien la humedad relativa parecería no afectar la variación de abundancia, ambas especies muestran una leve correlación negativa con la humedad relativa máxima. Esto explicaría los picos de abundancia durante los meses cálidos y con humedad relativa baja.

Si bien no se observaron parásitos intestinales en las disecciones realizadas, esto no descarta la circulación del parásito en los sitios estudiados, ya que podría deberse a la baja sensibilidad del método, o por tratarse de un periodo inter-epidémico de baja transmisión.

En conclusión, la presencia de vectores competentes de LT y LV como *Ny. neivai* y *Mg. migonei* en ambientes próximos al domicilio con registros en el bosque, significaría un factor de riesgo en la región aumentando las probabilidades del contacto humano-vector-reservorio. El aumento en la frecuencia de estas especies en los meses cálidos y secos deberá ser considerado al momento de proponer medidas de control, debiendo enfocar las

acciones de prevención durante primavera y verano. Se hace necesaria la vigilancia entomológica periódica en sitios críticos para el alerta temprana sobre cambios en número o composición específica de poblaciones de *Phlebotominae*.

RESUMEN

En Argentina la Leishmaniasis Tegumentaria (LT) es endémica en 9 provincias de las Regiones del NOA, NEA y Chaco. La Leishmaniasis Visceral (LV) urbana, actualmente registra transmisión en 4 provincias del NEA. Motivo por el cual en la provincia del chaco, se seleccionaron tres sitios de estudio urbano-rurales con antecedentes de LT o sin investigación previa: Monte Alto, Margarita Belén y Colonia Benítez. En cada área de estudio se seleccionó una vivienda habitada donde se instalaron mensualmente durante una noche, trampas de luz tipo CDC de 12 hs de permanencia (19 a 7hs), en Domicilio, Peridomicilio y Extradomicilio; durante el período octubre 2010 – septiembre 2012. Se estudió la composición y dinámica mensual de la fauna de *Phlebotominae* y la correlación de abundancia con factores climáticos. Concomitantemente se estudió su posible infección natural con protozoarios del género *Leishmania*. Se capturaron en total 1499 *Phlebotominae* en los sitios estudiados. Se registraron 9 especies: *Brumptomyia brumpti*, *Brumptomyia avellari*, *Evandromyia cortezezzii*, *Evandromyia sallesi*, *Evandromyia evandroi*, *Migonemyia migonei*, *Sciopemyia sordelli*, *Nyssomyia neivai*, *Psathyromyia shannoni*. Las especies predominantes fueron *Mg. migonei* (41.03%) seguido de *Ny. neivai* (38.96%) y *Ev. Complejo cortezezzii* (9.54%). La variación estacional de los *Phlebotominae*, mostró una mayor abundancia en verano y primavera, seguido por otoño e invierno. Se realizaron 62 disecciones de *Phlebotominae* provenientes de los sitios estudiados, no se observaron parásitos intra-intestinales. En conclusión, la presencia de vectores competentes de LT y LV como *Ny. neivai* y *Mg. migonei* en ambientes próximos al domicilio con registros en el bosque, como así también el aumento en la frecuencia de estas especies en los meses cálidos y secos significaría un factor de riesgo en la región. Se hace necesaria la vigilancia entomológica periódica en sitios críticos para el alerta temprana sobre cambios en número o composición específica de poblaciones de *Phlebotominae*.

SUMMARY

Tegumentary Leishmaniasis (TL) in Argentina is endemic in 9 provinces of the Regions NOA, NEA and Chaco. Urban Visceral Leishmaniasis (VL) registers transmission in four provinces of NEA. Reason why in Chaco province, we selected three urban-rural study sites, with history of TL or without previous investigation: Monte Alto, Margarita Belén y Colonia Benítez. In each study area an inhabited dwelling was selected, in which CDC light traps were installed monthly overnight (19 to 7hs) during one night. The traps were installed at Domicile, Peridomicile and Extradomicile, over the period October 2010 - September 2012. Composition and dynamics of *Phlebotominae* fauna were studied, as well as correlations of abundance with climate factors. Concomitantly *Leishmania* natural infections were studied. A total of 1499 *Phlebotominae* were captured in the studied sites. Nine species were recorded: *Brumptomyia brumpti*, *Brumptomyia avellari*, *Evandromyia cortelezzi*, *Evandromyia sallesi*, *Evandromyia evandroi*, *Migonemyia migonei*, *Sciopemyia sordelli*, *Nyssomyia neivai*, *Psathyromyia shannoni*. The predominant species captured was *Mg. migonei* (41.03%) followed by *Ny. neivai* (38.96%) and *Ev. cortelezzi* (9.54%). The *Phlebotominae* seasonal variation, showed a greater abundance in summer and spring, followed by autumn and winter. Dissections of 62 *Phlebotominae* from the studied sites, were performed. No Intra-Gut parasites were observed. In Conclusion, the presence of competent vectors of TL and VL as *Ny. neivai* and *Mg. migonei* in environments near the domicile with forest records, as well as the species frequency increase during the hot, dry month; would mean a risk factor in this region. Periodical entomological surveillance becomes necessary in critical sites, to early warnings about changes in the number and specific composition of *Phlebotominae* populations.

REFERENCIAS

1. Córdoba Lanús, E.; Salomón, O.D.- *Phlebotominae* fauna in the province of Tucumán, Argentina. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 44¹: 23-27. 2002
2. Córdoba Lanús E.; Lizarralde De Grosso M; Piñero J.E.; Valladares B.; Salomón OD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. In northwestern argentina. Acta Trop 98(1): 1-5. 2006.
3. Fordellon Rosa Cruz, M.; Eunice A.B.G.; Fordellone Rosa Cruz, C.- Ecological aspects of the and fly fauna (Diptera, Psychodidae) in an American cutaneous

- Leishmaniasis endemic area under the influence of hydroelectric plants in Parana panama river, State of Paraná, Brazil. *Rev. Soc.Bras.Med. Trop.* 45(4):430-436. 2012.
4. Galati E.A.B. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. En: Rangel EF, Lainson R, editores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; p.53-175.2003.
 5. Gould, I. T.; et al. Leishmaniasis visceral en la Argentina: Notificación y situación vectorial (2006-2012). *Medicina (B. Aires)*. 73 (2): 104-110. 2013
 6. Rosa J.; Pita Pereira D.;Brazil R. P.; Andrade Filho J.D.; Salomón O. D.; Szelag E.A. Natural infection of *cortezzi* complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with *Leishmania braziliensis* in Chaco, Argentina, *Acta Tropica*. 123²:128-131. 2011
 7. Salomón, O.D.; Mocarbel, N. J.;Pedroni, E.;Colombo, J.;Sandillu, M.- Phlebotominae: vectores de Leishmaniasis en las provincias de Santa Fe y Entre Rios, Argentina. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 66: 220-224. 2006.
 8. Salomon, O.D.; et al. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) fauna in the Chaco region and Cutaneous Leishmaniasis transmission patterns in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 103(6): 578-584. 2008
 9. Salomón, O.D.; Quintana, M.G.; Bezzi, G.; Morán, M.L; Betbeder, E.; Valdéz, D.V-*Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Tropica*, 113(1):84–87. 2010.

GENOTIPOS DE VKORC-1 Y SENSIBILIDAD A LOS ANTICOAGULANTES ORALES. APOORTE DE LAS DETERMINACIONES GENÉTICAS PARA EL MANEJO PRÁCTICO Y LA PREVENCIÓN DE EVENTOS.

María Paula Vera Morandini, Alicia Noemí Blanco, Silvia Haydeé Grosso,
Susana Sara Meschengieser

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

OBJETIVO

Evaluar los SNPs 1173 C>T y -1639 G>A en pacientes bajo tratamiento anticoagulante oral, controlados habitualmente en el Departamento de Hemostasia y Trombosis, del Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", de la Academia Nacional de Medicina. Estimar su frecuencia y verificar su relación con el nivel de anticoagulación alcanzado (expresado como RIN) y la dosis de dicumarínicos, principalmente acenocumarol, requerida para lograr el nivel de anticoagulación deseado.

Nos propusimos también registrar las características étnicas, para analizar luego la frecuencia de los alelos, a fin de confirmar o descartar posibles diferencias entre individuos de origen caucásico y mestizos, descendientes de pueblos originarios de América.

RESULTADOS

Las frecuencias alélicas obtenidas para el SNP 1173 C>T y SNP -1639 G>A fueron similares, confirmando además que se hallan en desequilibrio de unión (X^2 Pearson<0,0001).

La dosis fue más alta (pBonferroni <0,0001), en los portadores de 1173 CC, comparada con la requerida en aquellos 1173CT o 1173 TT. También se observó una diferencia significativa (pBonferroni <0,011) entre la dosis media requerida por los portadores de 1173 CT y 1173 TT. De modo semejante a lo observado para el SNP 1173 C>T, la dosis media requerida por los portadores de -1639 GG fue mayor que para -1639 GA (pBonferroni <0,0001) o -1639 AA (pBonferroni <0,0001); siendo además significativa (pBonferroni <0,011) la diferencia entre -1639 GA y -1639 AA.

La dosis media fue menor en los mayores de 70 años, comparada con la dosis media en el resto de la población analizada ($p_{\text{Bonferroni}} < 0,05$); sin embargo, no hubo diferencias significativas (1173 C>T, $X^2_{\text{pearson}} = 0,224$ y -1639 G>A, $X^2_{\text{pearson}} = 0,384$) en la distribución de la frecuencia de los SNPs entre ambos grupos.

Los resultados confirman la relación entre los SNPs y la dosis requerida para una adecuada ACO, así como el menor requerimiento de dosis en los pacientes mayores de 70 años, independientemente de su genotipo.

Las diferencias observadas en relación a las frecuencias alélicas en los pacientes, divididos según el grupo étnico (caucásicos vs. pueblos originarios), no fueron significativas (1173 C>T, $X^2_{\text{pearson}} = 2,634$ y -1639 G>A, $X^2_{\text{pearson}} = 0,242$).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman que la frecuencia de los SNPs 1173 C>T y -1639 G>A de VKORC-1 en los pacientes analizados, mayoritariamente de origen caucásico, es semejante a la reportada en la literatura^{4,13} y que ambos SNPs se hallan en desequilibrio de unión. Además, corroboran en nuestra población la relación entre los SNPs 1173 C>T ó -1639 G>A y la dosis de dicumarínicos⁴.

Se observó que los pacientes mayores de 70 años requieren dosis menores que el resto, independientemente de su genotipo.

Al analizar la frecuencia de los alelos en caucásicos y mestizos (descendientes de los pueblos originarios de América), si bien no encontramos diferencias estadísticamente significativas que muestren un comportamiento diferente de la frecuencia alélica en ambos grupos étnicos, estos resultados son preliminares. El número de muestras de pacientes ($n: 19$) es pequeño, ello podría hacer no significativa la diferencia observada en el sentido de una mayor proporción de heterocigotos, de ambos SNPs, en los individuos descendientes de pueblos originarios. La inclusión de un número mayor de casos analizados podría dar peso estadístico a estas diferencias.

TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1. Frecuencias alélicas VKORC-1 1173 C>T

CC	37,3%
CT	40,2%
TT	22,5%

Tabla 2. Frecuencias alélicas VKORC-1 -1639 G>A

GG	38,2%
GA	36,3%
AA	25,5%

Tabla 3. Relación entre los SNPs 1173 C>T y -1639 G>A

	AA	AG	GG	TOTAL
TT	23	0	0	23
CT	3	36	2	41
CC	0	1	37	38
TOTAL	26	37	39	102

Tabla 4. Dosis media según la variante alélica - SNP 1173 C>T

1173 C>T	Dosis Media (mg/semana)
CC	22,95
CT	13,51
TT	7,09

Tabla 5. Dosis media según la variante alélica - SNP -1639 G>A

-1639 G>A	Dosis Media (mg/semana)
GG	22,36
GA	14,32
AA	7,19

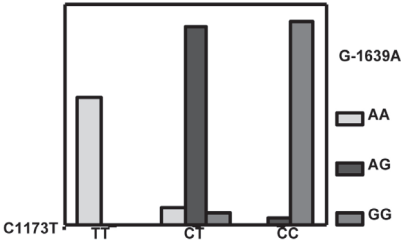
Tabla 6. SNPs y dosis de dicumarínicos

1173 C>T	-1639 G>A	Dosis Media (mg/semana)	N
TT	AA	7,09	23
	Total	7,09	23
CT	AA	8,00	3
	GA	14,00	36
	GG	13,00	2
	Total	13,51	41
CC	GA	26,00	1
	GG	22,87	37
	Total	22,95	38

Tabla 7. Dosis de dicumarínicos según el grupo etario

Edad (años)	Dosis Media (mg/semana)	Casos (n)
≥70 (media 78,8)	12,29	50
<70 (media 52,6)	18,30	52

Gráfico 1. Desequilibrio de unión - Relación entre los SNPs 1173 C>T y -1639 G>A



Las relaciones entre ambos SNPs se muestran en la TABLA 3 y en el GRÁFICO 1; del análisis estadístico surge que 1173 C>T y -1639 G>A se hallan en ($X^2_{\text{Pearson}} < 0,0001$).

Tabla 8. Frecuencias alélicas VKORC-1 1173 C>T según etnia

	Caucásicos	Pueblos Originarios
CC	26,4%	26,3%
CT	39,6%	57,9%
TT	34,0%	15,8%

Gráfico 2. Frecuencias alélicas VKORC-1 1173 C>T según etnia

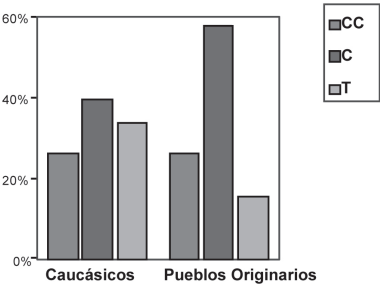
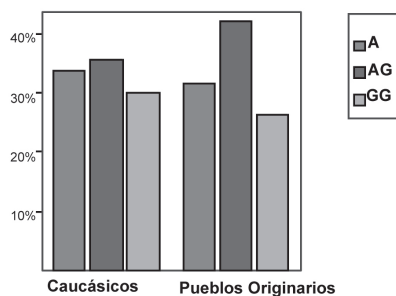


Tabla 9. Frecuencias alélicas VKORC-1 -1639 G>A según etnia

	Caucásicos	Pueblos Originarios
AA	34,0%	31,6%
AG	35,8%	42,1%
GG	30,2%	26,3%

Gráfico 3. Frecuencias alélicas VKORC-1 -1639 G>A según etnia

SUMMARY

AIM: The aim of the study was to analyze the polymorphisms (SNPs) 1173 C>T and -1639 G>A, and to estimate their frequency in patients under oral anticoagulation (OA). In addition, the relationship between the levels of OA achieved, expressed as international normalized ratio (INR), and the dose of acenocoumarol required to reach them, was evaluated. Moreover, the ethnic origin (caucasian or descendants of amerindians) of the patients was assigned according to a questionnaire and the frequency of alleles in both groups was determined in order to see possible differences between them.

Results: A similar allelic frequency distribution compared to previous reports, was obtained for 1173 C>T and -1639 G>A with linkage disequilibrium between them. The results confirm the relationship between SNPs and the dose of OA. The mean dose required was higher in patients homozygous for

1173 CC or -1639 GG alleles than in non-homozygous. In those individuals over the age of 70 a lower mean dose was necessary, regardless of genotype. Non significant differences were observed (Chi square, $p>0,05$) between allelic frequency of the SNPs in both ethnic groups.

Conclusions: The results of the study about the frequency of SNPs 1173 C> T and -1639 G> (which are in linkage disequilibrium) and its relationship with the required dose of acenocoumarol are in accordance with that reported in the literature. Doses were higher for carriers of 1173 CC and/or -1639 GG; the later genotype was a better predictor of the sensitivity to OA. Moreover, patients older than 70 years require lower doses, regardless of genotype.

The analysis of the frequency of alleles in caucassians and descendants of the indigenous peoples of America, showed no statistically significant differences; however, more individuals should be analyzed in order to confirm this finding.

BIBLIOGRAFÍA

1. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, et al. A polymorphism in the VKORC-1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005; 105:645-49.
2. Lund K, Gaffney D, Spooner R, Etherington AM, Tansey P, Tait RC. Polymorphisms in VKORC-1 have more impact than CYP2C9 polymorphisms on early warfarin International Normalized Ratio control and bleeding rates. *Br J Haematol* 2012; 158:256-61.
3. Loeliger EA, Lewis SM. Progress in laboratory control of oral anticoagulants. *Lancet* 1982; 2:318-20.
4. Moyer TP, O'Kane DJ, Baudhuin LM, et al. Warfarin Sensitivity Genotyping: A Review of the Literature and Summary of Patient Experience. *Mayo Clin Proc* 2009; 84:1079-94.
5. Bodin L, Perdu J, Diry M, Horellou MH, Lorient MA. Multiple genetic alterations in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene (VKORC-1) can explain the high dose requirement during oral anticoagulation in humans. *J Thromb Haemost* 2008; 6:1436-9.
6. Watzka M, Geisen C, Bevens CG, et al. Thirteen novel VKORC-1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. *J Thromb Haemost* 2011; 9:109-18.
7. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, et al. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation* 2007; 116:2563-70.
8. Hirsch M, Pluschnig U, Kundi M, Katzenschlager R. Oral anticoagulation in older patients with vascular or cardiovascular diseases: aged over 70 years: same risk? Same benefit? *Int Angiol*. 2003; 22:370-75.
8. Shireman TI, Mahnken JD, Howard PA, Kresowik TF, Hou Q, Ellerbeck EF. Deve-

- lopment of a contemporary bleeding risk model for elderly warfarin recipients. *Chest*. 2006; 1305:1390-96.
9. Pautas E, Moreau C, Gouin-Thibault I, et al. Genetic Factors (VKORC-1, CYP2C9, EPHX1, and CYP4F2) Are Predictor Variables for Warfarin Response in Very Elderly, Frail Inpatients. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 87:57-64.
 10. Vera Morandini MP, Meschengieser SS, Bastos LA, et al. Vitamina K epóxido reductasa (VKORC-1). Polimorfismos y sensibilidad a los Dicumarínicos. *Bol. A. N. de Medicina* 2012; 90¹ (en prensa).
 11. Guyatt GH, Akl EA, Crowther M, Gutterman DD, Schünemann HJ; *Chest* 2012; 141 (Suppl):7S-47S.
 12. Lubitz SA, Scott SA, Rothlauf EB, et al. Comparative performance of gene-based warfarin dosing algorithms in a multiethnic population. *J Thromb Haemost* 2010; 8:1018–26.
 13. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, et al. Effect of VKORC-1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med*. 2005; 352:2285-93.
 14. Botton MR, Bandinelli E, Rohde LE, Amon LC, Hutz MH. Influence of genetic, biological and pharmacological factors on warfarin dose in a Southern Brazilian population of European ancestry. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 72:442-50.
 15. Vargens DD, Damasceno A, Petzl-Erler ML, Suarez-Kurtz G. Combined CYP2C9, VKORC-1 and CYP4F2 frequencies among Amerindians, Mozambicans and Brazilians. *Pharmacogenomics* 2011; 12:769-72.
 16. Suarez-Kurtz G, Pena SD, Struchiner CJ, Hutz MH. Pharmacogenomic Diversity among Brazilians: Influence of Ancestry, Self-Reported Color, and Geographical Origin. *Front Pharmacol*. 2012;191:1-7.
 17. Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, et al. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet*. 2005; 14:1745-51.



