
Anales

de la Fundación

Alberto J. Roemmers

Volumen XXVII

Libro de edición Argentina

Es propiedad
Derechos reservados.
© 2016, 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 2012-2014

ALTERACIONES EN LOS SISTEMAS ANGIOGÉNICOS VEGF, PDGF, ANGIOPOYETINAS Y S1P EN FLUIDOS FOLICULARES DE PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO D. Abramovich, L. Scotti, F. Parborell, G. Irusta, I. de Zuñiga, C. Bisioli, M. Tesone	13
ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y BIOLÓGICO DE BOCAVIRUS HUMANO 1 EN CÓRDOBA M. P. Adamo, L. Ghiotto, C. Insfrán, M. Pedranti, D. Majul, J. Orellana, L. Moreno	17
CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE AISLADOS CLÍNICOS DE MTB PREVALENTES EN ARGENTINA: EFECTO SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS M. Alemán	21
ECO-EPIDEMIOLOGÍA DE LA FIEBRE AMARILLA EN EL NORTE DE ARGENTINA H. D. Argibay, M. M. Orozco, M. A. Rinas, R. E. Gürtler	32
EFICACIA DE LA ACTIVIDAD FÍSICA MODERADA EN LA PREVENCIÓN DEL AUMENTO DE PESO DURANTE EL TRATAMIENTO DE LA ADICCIÓN AL TABACO EN PACIENTES ASISTIDOS EN UN CONSULTORIO DE CESACIÓN TABÁQUICA DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES: ENSAYO RANDOMIZADO Y CONTROLADO M. V. Armaleo	39
VIGILANCIA AMBIENTAL DE VIRUS ENTÉRICOS EN MATRICES ACUOSAS DE CÓRDOBA, ARGENTINA P. A. Barril, P. R. Cuadrado, M. N. Fernández, L. C. Martínez, M. O. Giordano, G. Masachessi, M. B. Isa, S. V. Nates	46

EVALUACIÓN DE LA MASA ÓSEA EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA M. L. Brance, L. R. Brun, S. Lioi, A. Sánchez, M. Abdala, B. Oliveri	49
ESTUDIO DE DELECIONES EN EL GEN FMR2 COMO CAUSA DE FALLA OVÁRICA PREMATURA N. Buzzalino, L. Espeche, A. Solari	52
GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE ORIGEN CLÍNICO Y AMBIENTAL DEL COMPLEJO CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS DEL NORDESTE ARGENTINO M. E. Cattana, M. de los A. Sosa, G. E. Giusiano	64
FARMACOGENÉTICA: ACERCÁNDONOS A LA MEDICINA PERSONALIZADA EN EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS J. Chamorro	79
AGENTES RICKETTSIALES EN ROEDORES, AVES Y MURCIÉLAGOS DE LA CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES G. L. Cicuttin, M. N. De Salvo, D. F. Brambati, C. Hercolini, E. Aristegui, M. I. Ardiles, A. C. Zotter, E. J. Boeri, F. J. Beltrán, F. E. Gury Dohmen	87
TRATAMIENTO CON ACETIL-L-CARNITINA Y NICOTINAMIDA EN NIÑOS EN RIESGO DE DIABETES TIPO 1. ESTUDIO LONGITUDINAL DE SU EVOLUCIÓN J. C. Cresto	97
PREVALENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN PACIENTES CON CÁNCER BUCAL. PRESENCIA DEL VIRUS EN SALIVA. RELACIÓN CON OTROS FACTORES DE RIESGO M. I. Criscuolo, R. A. Morelatto, J. Mosmann, C. Cuffini, S. A. López de Blanc	114
ESTUDIO DE LAS INFECCIONES CLAMIDIALES ATÍPICAS DEL TRACTO GENITAL ASOCIADAS A LA INFERTILIDAD C. Cuffini, M. Monetti, G. Paglini, P. Estofan, R. Molina	123

ESTUDIO DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS DE USO CLÍNICO DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DE <i>ASPERGILLUS TERREUS</i> M. S. Fernández, M. L. Mangiaterra	132
ESTUDIO DEL PASAJE DE LAS DROGAS ANTICHAGÁSICAS A LA LECHE MATERNA EN MUJERES LACTANTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS F. García-Bournissen, S. Moroni, M. E. Marson, G. Moscatelli, G. Mastrantonio, M. Bisio, L. Cornou, G. Ballering, J. Altcheh	137
CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR TH17 EN MUCOSA CERVICAL Y EN SANGRE PERIFÉRICA EN INDIVIDUOS HIV+ NO PROGRESORES A LARGO PLAZO VS PROGRESORES A SIDA M. M. Gherardi	147
BIOSEGURIDAD EN LA ATENCIÓN DE SALUD HUMANA. PROTECCIÓN CONTRA LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL AL VIRUS DE LA HEPATITIS B S. Fink, C. Ferrario	159
BASES MOLECULARES DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS QUE AFECTAN LA SÍNTESIS DE BETA-GLOBINA. ESTUDIO EN LA PROVINCIA DE TUCUMÁN B. A. Issé, M. E. Mónaco, S. Lazarte, A. C. Haro, E. Ledesma Achem, C. Jimenez	162
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DE LOS PROCESOS DE PROLIFERACIÓN, SOBREVIDA Y MIGRACIÓN, ESPECIALMENTE A HUESO, DE LA CÉLULA TUMORAL MAMARIA HUMANA. PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES V. Labovsky, L. Martínez, A. Matas, M. L. Calcagno, K. M. Davies KM, H. García-Rivello, A. Wernicke, N. A. Chasseing	170

COINFECCIÓN HIV-HEPATITIS C: ROL DE LA INMUNIDAD CELULAR ESPECÍFICA EN LA RESPUESTA A LA TERAPIA BASADA EN INTERFERÓN ALFA-PEGILADO N. L. Laufer	199
MARCADORES SEROLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS S. A. Longhi	207
ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE VITAMINA D EN MUJERES POSTMENOPÁUSICAS A. M. Masoni, I. Menoyo, G. S. Morosano, R. Bocanera , S. M. Pezzotto, M. E. Morosano	216
CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE SU UTILIDAD CLÍNICA J. Maymó, C. Varone	218
DETECCIÓN PRECOZ POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE GENOTIPOS CARCINOGENÉTICOS GASTROENTERO HEPÁTICOS DE HELICOBACTER PYLORI Y HELICOBACTER PULLORUM EN POBLACIÓN INFANTIL M. G. Medina, P. Motta, M. de los A. López	226
ANÁLISIS Y CORRELACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LOS GENES MARCADORES DE VIRULENCIA DOMINANTES <i>cagA</i> , <i>vacA</i> Y <i>babA</i> DE HELICOBACTER PYLORI EN MUESTRAS DE PACIENTES DISPÉPTICOS M. L. Medina	228
ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS Y EVALUACIÓN DE UNA ALTERNATIVA TERAPÉUTICA NATURAL PARA COMBATIR LA ENFERMEDAD G. Meresman, J. I. Bastón, L. Ferella	230

ESTUDIOS COMUNITARIOS EN PATOLOGÍAS TRANSMISIBLES Y NUTRICIÓN M. C. Minvielle, B. C. Pezzani, M. L. Ciarmela, D. Rosa, M. Isla Larrain, A. B. Orden, C. P. Martinez, A. Mariñelarena, M. del C. Apezteguía	237
RESPUESTA INMUNE AL STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE EN PACIENTES CON DEFICIENCIA ESPECIFICA DE RESPUESTA A ANTÍGENOS POLISACÁRIDOS C. Otero	250
PREDICTORES DE MAL PRONÓSTICO EN PACIENTES SÉPTICOS S. Perés, G. Camicia, M. Nogueras, E. Cunto	252
OPTIMIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PCR PARA DETECCIÓN DE PLASMODIUM EN MOSQUITOS Y SANGRE HUMANA EN LA TRIPLE FRONTERA ARGENTINO-BRASILEIRO- PARAGUAYA P. G. Ramirez, M. Stein, G. I. Oria, R. H. Lucero	256
DIVERSIDAD GENÉTICA Y ANÁLISIS DE MUTANTES DEL VIRUS DE HEPATITIS B EN LA PROVINCIA DE CÓRDOBA V. Ré, F. Gallego, M. B. Pisano, C. Torres, L. Caeiro, M. Martínez Wassaf, M. Balangero, R. Campos	264
EPIDEMIOLOGIA DE LA LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA EN UN ÁREA ENDÉMICA DE TRANSMISIÓN EN LA PROVINCIA DEL CHACO, ARGENTINA J. Rosa, E. A. Szelag, M. A. Parras, M. G. Quintana, O. D. Salomón	266
AJUSTE, VALIDACIÓN Y ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO A/G -1082 DEL GEN IL10 EN PACIENTES CON HEMOFILIA A SEVERA. SU RELACIÓN CON LA FORMACIÓN DE INHIBIDOR DEL FACTOR VIII TERAPÉUTICO L. C. Rossetti, M. M. Abelleiro, M. Candela	273
EVALUACIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS Y CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER COMO POSIBLES MARCADORES PRONÓSTICO EN TUMORES PRIMARIOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA O. G. Scharovsky, V. R. Rozados, M. J. Rico	283

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI-ERBB-2 EN CÁNCER DE MAMA R. Schillaci, M. F. Mercogliano, M. De Martino, G. Inurrigarro, I. Frahm	297
EXPOSICIÓN A NIVELES ELEVADOS DE ARSÉNICO EN EL AGUA DE BEBIDA Y SU IMPACTO SOBRE LA SALUD EN UNA POBLACIÓN DE LA PROVINCIA DE TUCUMÁN A. G. Soria de González, L. M. Tefaha, R. S. Guber, R. Toledo, A. Liatto de Nogalo, S. E. Roshdestwesnky, S. Pilar	307
PREDICTORES DE PÉRDIDA SIGNIFICATIVA DE MASA Y FUERZA MUSCULAR EN ADULTOS MAYORES INTERNADOS EN EL HOSPITAL ALEMÁN G. M. Vázquez, M. E. Manzotti, M. C. Perret, G. Alessandrini, S. Lemos, H. N. Catalano	314
DETECCIÓN DE PAPILOMAVIRUS HUMANO (VPH) EN LESIONES DE LA CAVIDAD ORAL: COMPARACIÓN CON OTROS FACTORES DE RIESGO R. F. Venezuela, A. Talavera, M. C. Frutos, A. X. Kiguen, M. S. Monetti, M. Sollazo, R. Panico, R. Tomasi, R. Ferreyra de Prato, C. G. Cuffini	322



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 2012–2014, 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



ALTERACIONES EN LOS SISTEMAS ANGIOGÉNICOS VEGF, PDGF, ANGIOPOYETINAS Y S1P EN FLUIDOS FOLICULARES DE PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

Scotti Leopoldina, Parborell Fernanda, Irusta Griselda, de Zuñiga Ignacio,
Bisioli Claudio, Tesone Marta, Abramovich Dalhia.
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME- CONICET)

RESUMEN

El Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS) es la principal causa de disfunciones reproductivas y metabólicas en mujeres en edad fértil. Sin embargo, tanto su causa como su tratamiento continúan siendo enigmas para la medicina, y los tratamientos aplicados actualmente son mayormente empíricos. Sus principales características son el hiperandrogenismo y la morfología de ovario poliquístico. Presenta como principales manifestaciones clínicas la infertilidad, ausencia o irregularidades menstruales, obesidad y signos de exceso de andrógenos, como hirsutismo y acné. A pesar de ser la alteración endocrina con mayor prevalencia entre las mujeres en edad fértil, muchos aspectos de su fisiopatología aún no se conocen. Por otra parte, al ser un síndrome que se presenta de manera heterogénea entre las distintas mujeres, el diagnóstico y tratamiento son temas en continuo debate.

Además de las características descriptas, las pacientes con PCOS presentan alteraciones en la angiogénesis ovárica. El proceso de formación y regresión de los vasos sanguíneos en el ovario se produce en forma cíclica y es imprescindible para una correcta función reproductiva. La regulación de la angiogénesis ovárica está dada principalmente por los factores angiogénicos. Mientras que el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) es el principal iniciador de la angiogénesis, la formación y diferenciación de una red vascular madura y funcional requiere de la acción coordinada de otros sistemas. Es decir, la presencia de una vasculatura estable requiere de una buena interacción entre el endotelio y las células murales (pericitos y células de músculo liso de origen mesenquimático). Esta comunicación intercelular se encuentra mediada por múltiples sistemas de factores de crecimiento como el de angiopoietinas (ANGPTs), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento tumoral (TGF- β) y esfingosina-1-fosfato (S1P) entre otros.

La familia de PDGF está compuesta por diversos factores, dentro de los cuales, el PDGFB y el PDGFD, mediante su receptor PDGFR β , son los involucrados en angiogénesis. Específicamente, las vías PDGFB o PDGFD/PDGFR β son esenciales en el reclutamiento de pericitos a los vasos recientemente formados.

Otra familia de factores angiogénicos involucrados en la estabilización de vasos sanguíneos, es la familia de las Angiopoyetinas (ANGPTs) que incluye a la ANGPT1, la ANGPT2 y su receptor TIE2. La ANGPT1 a través de la activación del receptor TIE2, participa en la maduración y estabilización de los nuevos capilares ya que regula el recubrimiento de estos capilares por células perivasculares. A pesar de que la ANGPT2 también se une a TIE2 con la misma afinidad que la ANGPT1, no es capaz de traducir la señal del receptor, por lo que se considera a la ANGPT2 como un antagonista que promueve la desestabilización de la vasculatura. Otro antagonista natural del sistema es la forma soluble del receptor TIE2 (sTIE2), el que actúa atrapando a la ANGPT1 soluble y no le permite la unión al receptor TIE2 de membrana.

S1P es un esfingolípido que actúa a través de receptores acoplados a proteína G (S1P1-5), induciendo distintas respuestas celulares como migración, proliferación, supervivencia y permeabilidad vascular. S1P posee un rol fundamental como mediador de la estabilidad e integridad vascular. Por un lado, disminuye la permeabilidad vascular, aún la inducida por VEGF. Por otro lado, a través del mecanismo de señalización Rac, promueve el tráfico de N-caderina (proteína de uniones adherentes) hacia la membrana plasmática de las células endoteliales, favoreciendo el contacto de estas células con células de músculo liso. También estimula la expresión de VEGF por células endoteliales, estimulando en forma indirecta la angiogénesis.

Ha sido ampliamente descripto que las pacientes con PCOS tienen altos niveles de VEGF en suero, el cual proviene de una elevada producción ovárica. Sin embargo, no se han estudiado hasta ahora, otros sistemas angiogénicos en ovarios PCOS. Es por esto que la hipótesis del presente trabajo es que otros factores angiogénicos además de VEGF están alterados en el fluido folicular de ovarios de mujeres con PCOS. Por lo tanto, analizamos los niveles de PDGFB, PDGFD, ANGPT1, ANGPT2, sTIE2 y el esfingolípido S1P en fluidos foliculares de pacientes control y PCOS sometidas a técnicas de fertilización asistida (ART). Además, dado que estos factores regulan las proteínas de uniones intercelulares y la permeabilidad vascular, estudiamos el efecto del fluido folicular sobre la expresión de proteínas de uniones estrechas y adherentes en una línea celular endotelial.

Encontramos una disminución significativa en los niveles de PDGFB y PDGFD en fluido folicular de pacientes PCOS respecto a las controles. Encontramos además un aumento en los niveles del agonista ANGPT1 sin cambios en los antagonistas ANGPT2 y sTIE2 en estos fluidos foliculares. No se observaron cambios en las proteínas de unión VE-cadherina, β -catenina y ZO1 en la línea celular endotelial incubada en presencia de fluidos PCOS respecto a las incubadas con fluidos control. Encontramos que Claudina-5 se encuentra aumentada luego de 24 hs de cultivo con fluidos PCOS.

Por todo esto, en este trabajo demostramos por primera vez que existe una alteración en los sistemas de PDGF y ANGPT/TIE2 en fluido folicular de pacientes PCOS. Además, demostramos que, a pesar de los elevados niveles de VEGF presentes en estos FF y los niveles disminuidos que esperábamos observar en las proteínas de unión entre células endoteliales, VE-cadherina, β -catenina y ZO1 no se encuentran alteradas en PCOS y la Claudina-5 se encuentra incluso aumentada en estas células al ser incubadas con FF de pacientes PCOS. Por lo tanto, las alteraciones observadas en los sistemas de PDGF y ANGPT1 podrían estar previniendo la permeabilidad vascular inducida por VEGF en el ovario a través de la regulación de las proteínas de unión intercelular. El restablecimiento en los niveles de los factores angiogénicos podría considerarse como una nueva estrategia para el tratamiento de la fertilidad en el PCOS e incluso como prevención del OHSS en estas pacientes.

ABSTRACT

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is the most common endocrinological pathology among women of reproductive age. Among other diverse features, PCOS is characterized by abnormalities in ovarian angiogenesis. It is known that follicular fluid (FF) concentration and ovarian expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) are increased in PCOS patients. In this study, we examined the protein levels of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)B, PDGFD, and Angiopoietin 1 (ANGPT1) and ANGPT2 and their soluble receptor sTIE2, in FF from PCOS and control patients undergoing assisted reproductive techniques. We also analyzed the effect of FF from PCOS and control patients on tight and adherens junction protein expression in an endothelial cell line. We found significantly lower levels of PDGFB and PDGFD and significantly higher concentration of ANGPT1 in FF from PCOS patients than in FF from control patients. No changes were found in the

concentration of ANGPT2 and sTIE2 proteins. Expression of claudin-5 was significantly increased in endothelial cells incubated for 24 h in the presence of FF from PCOS patients than in FF from control ones, while VE-cadherin, β -catenin and ZO1 expressions were unchanged. The alterations observed in the levels of PDGFs and ANGPT1 may prevent VEGF-induced vascular permeability in the PCOS ovary by regulating endothelial cell junction protein levels. Restoring the levels of angiogenic factors may provide new insights into PCOS treatment and Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS) prevention in PCOS women.

ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO Y BIOLÓGICO DE BOCAVIRUS HUMANO 1 EN CORDOBA

Lucía Ghietto, Constanza Insfrán, Mauro Pedranti, Diego Majul, Julio Orellana, Laura Moreno, María Pilar Adamo.

Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella" y Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba.

RESUMEN

Antecedentes y objetivo. Los bocavirus humanos (HBoV) son parvovirus descubiertos recientemente, de los cuales al presente se han identificado 4 tipos: las cepas HBoV2, HBoV3 y HBoV4 aisladas casi exclusivamente del tracto entérico, y HBoV1 detectado principalmente en el tracto respiratorio. HBoV1 es uno de los virus que integran la larga lista de agentes de infección respiratoria aguda (IRA), una de las patologías más importantes en el mundo por ser una causa sustancial de morbilidad, particularmente en las edades extremas de la vida. El HBoV1 ha sido asociado a IRA alta y baja, principalmente en niños, con prevalencias ampliamente variables; en estudios locales previos se encontró elevada frecuencia de HBoV1 (6-23%) en niños hospitalizados por IRA baja (bronquiolitis, neumonía). Sin embargo, el rol etiológico de HBoV1 en la patología respiratoria se investiga debido a las altas tasas de coinfección reportadas y por su detección en individuos sanos. En este contexto, se plantean varias hipótesis posibles: la presentación clínica depende de la carga viral; HBoV1 podría establecer infecciones persistentes siendo el virus detectable meses después de la convalecencia; o bien la primoinfección sintomática ocurre a muy temprana edad y luego se producen numerosas reinfecciones asintomáticas. Aunque la historia natural de la infección aún no se conoce, el virus ha sido detectado en muestras de sangre de algunos pacientes. A fin de ampliar estos datos y contribuir al estudio de la historia natural de la infección por HBoV1 y su relación con la patogenia viral, en este trabajo se investigó la presencia del virus en suero de grupos de individuos sin manifestaciones de IRA (individuos sanos, pacientes con artropatías, inmunosuprimidos, pacientes con leucemias, anemias, y pacientes con exantema febril) y se identificaron condiciones para el aislamiento en cultivo celular.

Métodos. La detección del virus en muestras de suero recolectadas entre 2006 y 2011 se realizó mediante PCR-electroforesis en gel de poliacrilamida y secuenciación; la carga viral se estimó por PCR en tiempo real utilizando un protocolo con SybrGreen y un método de cuantificación relativa basado en el modelo 2^{-ddC}. Para los ensayos con cultivos se preparó el inóculo viral a partir de una muestra respiratoria con detección únicamente de HBoV1 y se utilizaron células Vero y Caco-2. La infección se corroboró por PCR a partir de muestras del sobrenadante y de extractos de las células adheridas al sustrato. Se realizaron registros diarios de los cultivos observados al microscopio de fase invertida y de las monocapas teñidas con hematoxilina y eosina para identificar la aparición de efecto citopático (ECP).

Resultados. En relación al estudio sobre grupos de pacientes con diferentes patologías y sujetos sanos, se estudiaron 221 individuos. Se detectó HBoV en 12 de ellos (5,4%), habiéndose observado la presencia del genoma del virus en la mayoría de los grupos analizados: pacientes inmunosuprimidos (HIV+ con recuento de linfocitos T CD4+ menor a 200 por mm³), pacientes con exantema febril, pacientes con anemia e individuos sanos, tanto niños como adultos. Las prevalencias de los grupos de pacientes inmunosuprimidos, con exantema febril y anemia fueron significativamente mayores que las del grupo de individuos sanos ($p < 0,05$, test Chi²). Todas las muestras tuvieron carga viral baja y todas las secuencias obtenidas agruparon en el cluster de HBoV1 (distancia genética promedio entre aislamientos HBoV1: 0,014). Por otra parte, con respecto al aislamiento de HBoV1 en cultivo, aunque en ninguna de las condiciones ensayadas (incubaciones a 33 y 37°C, con y sin DEAE-dextran) se pudo apreciar la manifestación de ECP tanto en Vero como en Caco-2, las pruebas de PCR mostraron la presencia de HBoV1 tanto en el medio de cultivo sobrenadante como en las células de la monocapa, 1 a 6 días post-infección (dpi) de manera conspicua en cultivos Caco-2. Si bien no se registró ECP en la infección primaria, ensayos adicionales de pasajes ciegos de cultivos inoculados mostraron la aparición ECP a partir del tercer cultivo continuo y sucesivo en la condición 37°C-DEAE-dextran 1 µg/ml.

Discusión y conclusiones. En este trabajo se investigó la presencia del virus en suero de individuos sin manifestaciones de IRA (individuos sanos y pacientes inmunosuprimidos, con artropatías, leucemias, anemias, y exantema febril). La prevalencia global en la muestra estudiada fue 12/221 (5,4%), habiéndose detectado el virus en niños y adultos de todos los grupos excepto pacientes con leucemias y artropatías. Si bien a menores tasas que en los pacientes con IRA previamente estudiados, estos datos muestran la amplia

circulación del HBoV en la población. La frecuencia de detección en los grupos de pacientes fue significativamente mayor en comparación con el grupo de individuos sanos, lo cual podría sugerir la eventual capacidad del HBoV para replicarse con mayor eficiencia y/o persistir en tejidos de un hospedador con una enfermedad previa o con deficiencia inmunitaria. Al mismo tiempo, la detección de HBoV en el grupo de individuos sanos podría reforzar la posibilidad de que el virus establezca infecciones a largo plazo (persistentes más allá de la etapa de enfermedad y convalecencia), al menos en cierta proporción de individuos originalmente infectados. En conjunto, estos resultados suman evidencias a las hipótesis de persistencia y reinfecciones múltiples (quizás particularmente en aquellos individuos con enfermedades de base o previas a los eventos de contagio) y justifican seguir profundizando la investigación para esclarecer tanto la historia natural de la infección como la implicancia del virus en la patogénesis de la IRA y otras enfermedades asociadas. El análisis filogenético demostró la presencia de HBoV1 solamente, con muy poca variabilidad respecto a otros aislamientos locales secuenciados previamente y cepas de la misma especie de distintas regiones del mundo. La carga viral baja en todos los individuos positivos contrasta con lo observado en pacientes con IRA, por lo cual estos resultados podrían contribuir a indicar el potencial patogénico de HBoV en la IRA: en los pacientes con esta patología las cargas virales en muestras clínicas de la vía aérea y en suero pueden ser altas, medias o bajas, pero en individuos sin IRA son bajas. Por lo tanto, independientemente de otras patologías en las que el HBoV1 pueda estar involucrado, en la IRA la carga viral alta podría influenciar el desarrollo de la enfermedad. En relación a los ensayos con cultivos, la detección del genoma viral incluso a 6 dpi, tanto en células de la monocapa como en el medio sobrenadante de cultivos de células Caco-2 indica que el virus puede replicarse en estas células cuando el medio de cultivo es suplementado con DEAE-dextran. Si bien la infección es no lítica al principio (la infección primaria no se asocia a ECP), a partir del tercer pasaje ciego se hace evidente un efecto de la replicación viral que incluye muerte celular. Dado que en los ensayos estándares de infección se comprueba la presencia del virus en ausencia de muerte celular, es posible que en cultivos de células Caco-2 el HBoV1 sea capaz de establecer una infección persistente. Otros ensayos adicionales de diversa índole permitirán definir más detalladamente el modelo de cultivo para utilizarse como sistema *in vitro* en estudios básicos del virus y de la relación HBoV1-célula hospedadora. Avanzar en tal sentido será importante para proveer una alternativa práctica para ser utilizada como sustrato para el

cultivo del virus, con fines tanto de investigación como para desarrollo tecnológico (métodos diagnósticos).

ABSTRACT

Human bocavirus 1 (HBoV1) is a parvovirus associated to acute respiratory infection (ARI), a world-wide main pathology that represents a substantial cause of morbimortality particularly in childhood and the elderly. The virus has been reported mainly in infants and in previous studies we have detected high HBoV1 frequency (6-23%) in children hospitalized with lower ARI (bronchiolitis, pneumonia). However, the etiological role of HBoV1 in respiratory illness is investigated due to the elevated rates of coinfection and the detection of the virus in healthy individuals. In this context, it has been proposed that high viral loads trigger clinical manifestations; alternatively, HBoV1 could establish persistent infections or multiple reinfections could occur throughout childhood. In order to contribute to the study of HBoV1 natural history, in this work we screened for the virus genome in serum samples of individuals without ARI and searched for culture conditions for *in vitro* isolation. **Results:** we detected HBoV1 in 12/221 (5.4%) individuals, including children and adults of healthy controls, patients with anemia, patients with febrile exanthema or immunosuppressed patients. The prevalence was significantly higher in patients compared to controls ($p < 0.05$, test χ^2), but all samples had low viral loads. Concerning the culture assays, the virus was detected by PCR in the supernatant medium and in nucleic acid extracts from cells in the monolayer of Caco-2 cultures 1 to 6 days post-infection [not associated to cytopathic effect (CPE)], when the medium was supplemented with DEAE-dextran. After the third blind passage of infected cultures (with DEAE-dextran) a mild CPE consisting of cell death was observed. In conclusion, our results show extensive circulation of HBoV1 in the population. Additionally, detection of the virus up to 6 dpi in the supernatant medium and in the monolayer of infected cultures suggests that HBoV1 can replicate in Caco-2 cells supplemented with DEAE-dextran.

CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE AISLADOS CLÍNICOS DE *MTB* PREVALENTES EN ARGENTINA: EFECTO SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Dra. Mercedes Alemán

IMEX-CONICET-ANM, Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

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 pequeñas gotas que lo contienen. En el pulmón, es fagocitada por macrófagos alveolares (Mφ) siendo las primeras células en ser infectadas por *Mtb*⁽¹⁾. Las células dendríticas (CD) constituyen una red densa en la mucosa respiratoria⁽²⁾ y su interacción temprana con *Mtb* es fundamental para montar una respuesta inmune protectora particularmente en la TB primaria. Las CD y los Mφ infectados inician una respuesta inflamatoria exudativa 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 la fagocitosis de la misma con posterior formación de una barrera de células inflamatorias rodeando al Mφ infectado (granuloma).

El éxito de la infección depende principalmente de las estrategias de evasión de la respuesta inmune y de la capacidad de las células presentadoras de antígeno (CPA) de iniciar una eficiente respuesta. En este sentido, las células dendríticas (CD) son críticas para el desarrollo de la respuesta inmune antibacteriana y, por lo tanto, constituyen un blanco fundamental en la evasión inmunológica inducida por *Mtb*. En trabajos anteriores demostramos que *Mtb* es capaz de alterar el proceso de diferenciación de CD a partir de Mo de circulación, comprometiendo la generación de una respuesta efectiva contra la micobacteria⁽³⁾. Específicamente, *Mtb* altera la diferenciación hacia CD a través de la secreción de IL-10 y la activación de TLR-2, generando CD con una baja expresión de los receptores de entrada para la bacteria (CD11b, DC-SIGN, MR) y reducida capacidad de presentación de antígenos

micobacterianos en el contexto de moléculas CD1 (que es la que promueve la proliferación de clones T específicos). Estos resultados son coincidentes con las CD obtenidas a partir de Mo de sangre de pacientes con TB. Antes se pensaba que la patogenia de la TB dependía de factores asociados al hospedador pero ahora parece claro que, factores bacterianos también estarían asociados a la enfermedad y a la latencia. La variabilidad de ciertos genes asociados a la virulencia y patogénesis del *Mtb* puede ser leve, y aún así llevar a diferencias fenotípicas marcadas. La mayoría de las cepas de *Mtb* en Argentina pertenecen al linaje LAM (Latin American and Mediterranean) y al Haarlem. En particular, la cepa M (MDR) perteneciente al linaje Haarlem puede considerarse un genotipo altamente exitoso ya que es capaz de prevalecer y persistir sobre otras cepas MDR en la comunidad y pudo adquirir resistencia sin perder su habilidad de diseminación.

A nivel global se han definido seis linajes filogenéticamente distintos con fuertes asociaciones con su origen geográfico, a saber: Euro-americano, Asiático del este, Indo-Océánico, Africano-Este, Africano-Oeste 1 y Africano-Oeste 2⁽⁴⁾. En Argentina se reportaron en 2006 un total de 11,464 casos nuevos de tuberculosis (TB), con una incidencia de 29.1 cada 100,000 habitantes. En los 90's, la TB resistente a múltiples drogas (MDR-TB) ocurría en 4.5% de los casos de TB principalmente debido a la transmisión de la enfermedad entre aquellos pacientes hospitalizados con SIDA⁽⁵⁾ y por lo tanto, inmunosuprimidos⁽⁶⁾. En nuestro país, el linaje prevalente es el Euro-Americano que comprende diferentes familias: Haarlem, Latino-Americano-Mediterráneo (LAM), familia X (Europea IS6110 de bajas bandas), familia S y familia T^(7, 8, 9). La técnica de RFLP basada en la secuencia de inserción IS6110, ha permitido identificar cepas de amplia diseminación, cepas responsables de brotes o aquellas que causaron casos únicos de TB. El brote más importante en nuestro país fue el comunicado por el Hospital Muñiz de Buenos Aires, donde se aisló una cepa resistente a 5 o más drogas, la que fue denominada cepa M de la familia Haarlem, siendo posteriormente comunicada en otros centros de salud del área metropolitana. Otros brotes de menor magnitud asociados a SIDA tuvieron lugar en algunos hospitales de la Ciudad de Buenos Aires (cepa C) y en el hospital Carrasco de la Ciudad de Rosario (cepas Ra, Rb, Rc)^(10, 11, 12). Más de una década después, estos brotes aún no han sido controlados.

En los últimos años se han podido identificar varios genes involucrados en la virulencia y la patogenicidad del *Mtb*⁽¹³⁾. Pequeñas variaciones en estos genes, pueden determinar grandes diferencias fenotípicas a nivel de la estructura de la micobacteria condicionando el reconocimiento del *Mtb* por

las células del sistema inmune. En este contexto, se han reportado diferencias en la respuesta inmune evocada entre cepas resistentes de la familia Haarlem⁽¹⁴⁾. Es conocida la importancia que las variaciones genéticas tienen para la formulación de vacunas protectivas por lo tanto, para lograr este objetivo es importante determinar la respuesta inmune inducida por los linajes autóctonos y su interacción con el huésped.

En el marco de la caracterización de las familias de mayor prevalencia en Argentina, LAM y Haarlem, evaluamos el efecto de las cepas mas representativas de estos grupos, sobre el proceso de diferenciación de CD que, siendo células clave en la inmunidad contra *Mtb* podría determinar un efecto directo en la respuesta adaptativa. Este fenómeno, podría considerarse un mecanismo de evasión que explicaría el hecho de que ciertos genotipos se diseminen con gran facilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados clínicos de *Mtb*. Se emplearán aislados clínicos de *Mtb* pertenecientes a los linajes LAM (LAM) y Haarlem (M) obtenidos del esputo positivo de pacientes con tuberculosis pulmonar activa (TB). Como control se utilizará la cepa de referencia H37Rv perteneciente al linaje T. Todas las cepas son crecidas en medio Middlebrook 7H9 broth (a 37°C en 5% CO₂). Las bacterias se cosecharán, y lavarán tres veces y se resuspenderán en PBS libre de pirógenos. Para su uso son inactivadas por irradiación gamma, suspendidas en PBS a OD600 nm de 1 (~ 10⁸ bacteria/ml) y almacenadas a -20°C.

Generación de DC derivadas de monocitos de sangre periférica (MoDC). PBMC se aislarán de sangre periférica de individuos sanos (n=15) y PPD+ (n=7) por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. Las MoDC se obtendrán incubando en placas de 24 pocillos las PBMC durante 2h en estufa con (10 ng/ml) GM-CSF, luego de lo cual se removerán las células no adherentes (*). Se lavará la placa con SF tibia y se adicionará medio RPMI-1640 suplementado con SFB 10%, penicilina (100U/ml) streptomycin (100 µg/ml) (medio completo, MC) con el agregado de GM-SCF (50 ng/ml) IL-4 (10ng/ml) cultivándose en estufa por 6 días. Alternativamente, se agregará *Mtb* (1:2, 1:1 y 2:1 *Mtb*:Mo) al inicio del cultivo (*Mtb*-DC).

Fenotipo de DC. Luego de 6-7 días se evaluará el fenotipo de las *Mtb*-DC y DC obtenidas por la expresión de CD1a, CD1b, CD14, DC-SIGN, CD86 e IFN γ intracelular mediante citometría de flujo.

Producción de ROS. 2×10^5 *Mtb*-DC y DC se madurarán con LPS (100 ng/ml) durante 24 hs y se incubarán 15 min. con DHR (5 μ g/ml) a 37°C. Para inducir la generación de ROS se incubarán en presencia de *Mtb* (5:1 *Mtb*:DC) durante dos horas. Como control positivo se utilizará PMA (10ng/ml). La oxidación de la DHR se detectará por citometría de flujo en el canal FL-1.

Linfocitos LT (*). se obtienen de la fracción no adherente, se lavan y se dejan en MC en estufa en concentraciones subóptimas de IL-2 hasta su empleo en ensayos de proliferación.

Ensayo de proliferación de DC y *Mtb*-DC. DC estimuladas y *Mtb*-DC se cultivarán por 5 días con 1×10^5 linfocitos en relaciones de Ly:CD: 100:1, 50:1 y 10:1 en placa de 96 pozos. La proliferación se detecta por incorporación de ^{3} H-timidina en las últimas 18 hs de cultivo.

RESULTADOS

En este trabajo mostramos que el aislado clínico Ra durante el proceso de diferenciación de monocito a células dendríticas (CD) induce una notable disminución en el porcentaje de células que expresan alto DCSIGN y bajo CD86 (población CD86^{low}/DCSIGN^{high}) y que, por el contrario, el aislado M conserva dicha población. El siguiente objetivo fue evaluar si dicha alteración se ve reflejada en la funcionalidad de las células, como presentadoras de antígenos del *Mtb* (Figura 1)

La presencia de ambos aislados clínicos provoca una reducción de la expresión de moléculas presentadoras de antígenos lipídicos como CD1 en las CD diferenciadas. Sin embargo, el efecto de la cepa M es significativamente menor. La pérdida del marcador monocítico CD14, tampoco es alterado en presencia del aislado M, mientras que Ra tiende a conservarlo (Figura 2).

Para evaluar el impacto de estos cambios fenotípicos sobre la presentación de antígenos micobacterianos por las CD, realizamos ensayos de proliferación empleando linfocitos autólogos a partir de donadores sanos PPD+. Como puede observarse en la Figura 3, la presencia de Ra durante la diferenciación de Mo a CD, indujo la generación de población celular con una menor capacidad de estimular la proliferación de clones específicos. Contrariamente, si bien la proliferación inducida por M-CD fue baja, no se vio alterada con respecto a la inducida por CD normalmente diferenciadas. Estos resultados correlacionan con el perfil de diferenciación de CD observado en presencia de M, que permite la adquisición del CD1 necesario para la presentación de antígenos lipídicos, abundantes en *Mtb*.

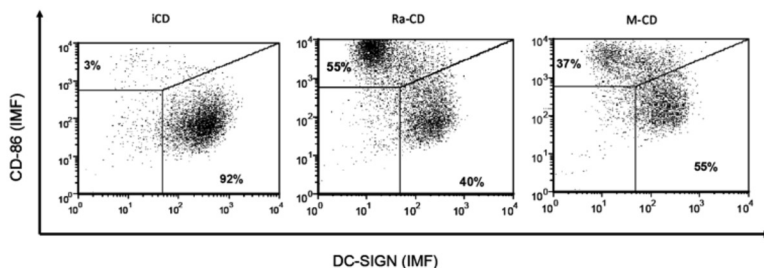


Figura 1: Mo de sangre periférica de dadores sanos fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4 y GM-CSF en ausencia (iCD) o presencia de *Mtb* a relación 2:1 *Mb*: Mo. Al sexto día las células se cosecharon, se lavaron y se marcaron con anti-DCSIGN-FITC y anti-CD86-PeCy5, determinándose la fluorescencia por citometría de flujo. Experimento representativo de 15.

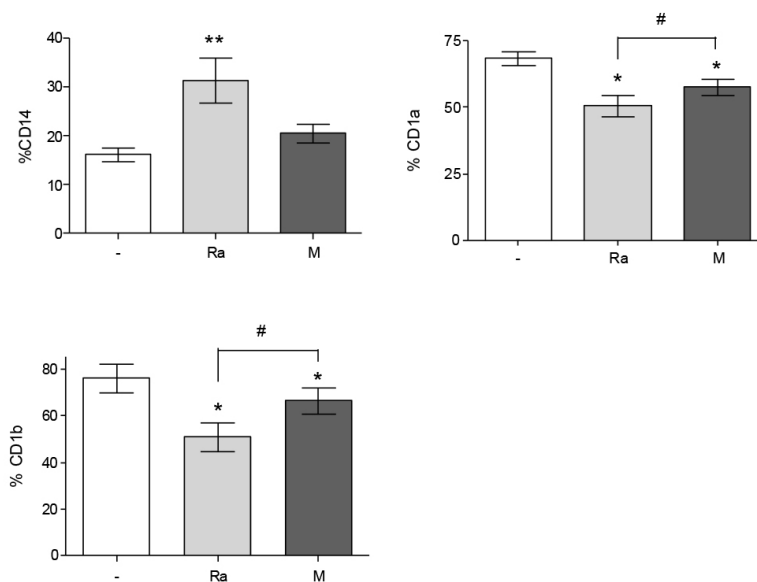


Figura 2: Mo de sangre periférica de dadores sanos fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4 y GM-CSF en ausencia (iCD) o presencia de *Mtb* a relación 2:1 *Mb*: Mo. Al sexto día las células se cosecharon, se lavaron y se marcaron con anti-CD1a, anti-CD1b o anti-CD14. Ra vs. iCD **p<0.001; M vs. iCD: *p<0.02; Ra vs. M: #p<0.02.

Como informamos en el periodo anterior, la presencia de Ra durante la diferenciación de los Mo, genera dendríticas con menor capacidad de inducir la proliferación de clones específicos para *Mtb* respecto a las dendríticas diferenciadas normalmente y estimuladas con Ra.

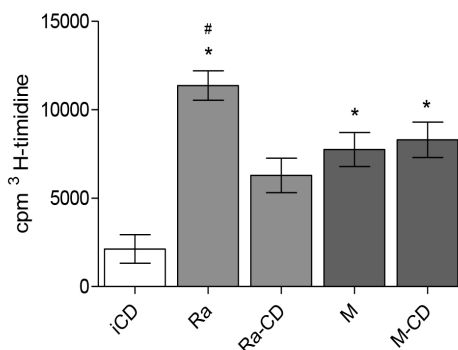


Figura 3: Mo de sangre periférica de dadores sanos PPD+ fueron diferenciadas a CD en presencia o no de Ra y M. Las CD normalmente diferenciadas fueron luego estimuladas por 48 h adicionales con Ra o M (relación: 2:1 *Mtb*:CD). Las células obtenidas se cocultivaron con los Ly autólogos por 5 días (10:1 Ly:CD), agregando ³H-timidina durante las últimas 18 h de cultivo. Los resultados se expresan como el promedio $\pm$ el error estándar de las cuentas por minuto (cpm). Ra vs. iCD: * $p < 0.001$; M y M-CD vs. iCD: * $p < 0.05$; Ra vs. Ra-CD, M y M-CD: # $p < 0.01$

A fin de dilucidar los mecanismos de acción de la cepa sobre las CD, evaluamos la maduración y capacidad efectora de las CD ya diferenciadas frente a los aislados clínicos. Las micobacterias inducen en las CD el aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD86) y marcadores de maduración (CD83, CMH clase II), recientemente se demostró que también producen IFN- γ vía TLR2. Así pues evaluamos el efecto de los aislados clínicos Ra y M en cuanto a la expresión de CD86, HLA-DR y la producción de IFN- γ e IL-12. Como muestra la Figura 4, Ra genera en las CD un fenotipo más maduro, con mayor expresión de CD86 y HLA-DR con respecto al aislado M. Además induce una mayor producción de IFN- γ .

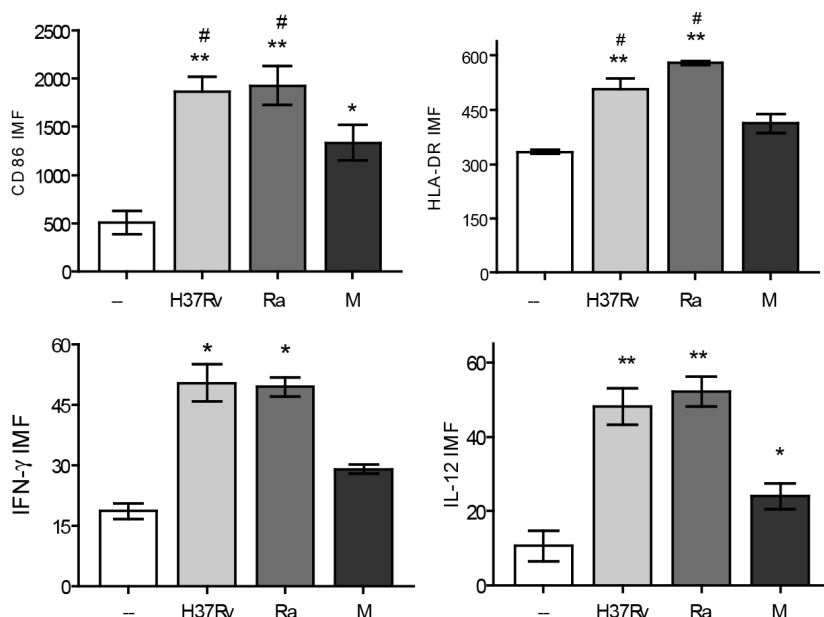


Figura 4: marcadores de maduración en CD. $2,5 \times 10^5$ CD se incubaron en presencia o no de los aislados clínicos de *Mtb* a relación 2:1 *Mtb*: CD durante 48 h. Durante las últimas 4-6 horas de cultivo se adicionó al medio brefeldina ($5\mu\text{g/ml}$). Luego las células se lavaron y se permeabilizaron según se detalla en materiales y métodos, marcándose luego con anti CD86-PeCy5, anti HLA-DR-PE, anti IFN- γ -FITC, y anti IL-12, detectándose la fluorescencia por citometría de flujo. iCD vs. Ra: ^{**} $p < 0.01$; iCD vs. M: ^{*} $p < 0.05$; Ra vs. M: [#] $p < 0.01$.

Dicho fenotipo se ve reflejado en la funcionalidad de las células como presentadoras de antígenos, lo que corroboramos evaluando su capacidad de inducir presentación de antígenos de *Mtb* (Figura 5) y estallido respiratorio (Figura 6).

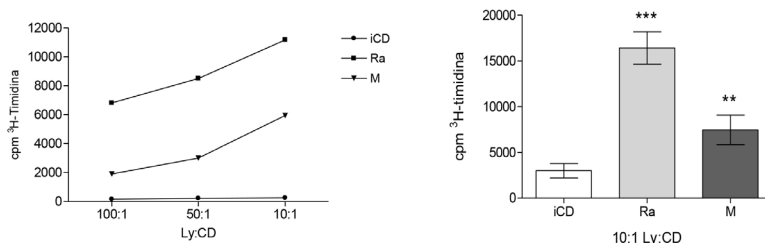


Figura 5: CD obtenidas a partir de dadores sanos PPD+ y maduras en presencia de Ra o M, se cocultivaron con linfocitos (Ly) autólogos a relaciones 10:1, 50:1 y 100:1 (Ly: CD) por 5 días. La proliferación se determinó por la incorporación de ³H-timidina durante las últimas 18 h de cultivo, detectándose mediante un contador de centelleo β. (A) Ejemplo representativo (B) Proliferación de linfocitos autólogos a relación 10:1. Los resultados se expresan como el promedio ± el error estándar de las cuentas por minuto (cpm). ***p<0.001 vs. iCD; **p<0.05 vs. iCD

Por lo tanto, y así como observamos en los PMN (Romero, 2012), el aislado clínico M refleja una menor capacidad de activación con respecto al aislado Ra, generando CD con un perfil de maduración pobre, con baja capacidad de inducir una respuesta específica. Este fenómeno podría estar asociado a diferencias en la cápsula a nivel de los α-glucanos afectando la unión al menos a dectin-1, DC-SIGN o ambos.

En este sentido, se ha sugerido que las diferencias entre cepas de *Mtb* en su capacidad de diseminación y virulencia, podría deberse a la generación de diferentes perfiles en la respuesta inmune, debido en parte a variaciones estructurales en los glicolípidos de la pared micobacteriana. De hecho, se ha demostrado in vitro que *Mtb* y BCG difieren en el perfil de maduración inducido en las CD.

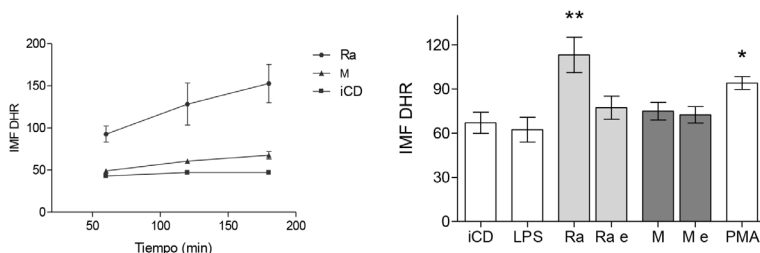


Figura 6: iCD fueron estimuladas con LPS (100ng/ml) durante 24 h y luego se incubaron con DHR (5µg/ml) durante 15 minutos a 37°C. Para inducir el estallido respiratorio, las células se enfrentaron a los aislados clínicos a relación 5:1 (*Mtb*: CD) durante 60, 120 o 180 minutos. Las CD pre-tratadas con LPS se incubaron con DHR (5µg/ml) durante 15 minutos a 37°C y luego se enfrentaron a los aislados clínicos tratados o no enzimáticamente o a PMA (10 ng/ml) durante 120 minutos. Ra vs. iCD: **p< 0.01 y PMA vs. iCD: *p< 0.03

CONCLUSIONES

Las diferencias a nivel de la composición/disposición espacial de los componentes de la pared del *Mtb* podrían actuar como mecanismo de evasión, en la medida que evitan o minimizan el reconocimiento por el sistema inmune (receptores de reconocimiento de patrones). En este sentido, observamos que el aislado clínico M induce una menor respuesta en las CD, con un perfil pobre de maduración, con baja capacidad de inducir proliferación específica, minimizando así el desarrollo de una respuesta protectora. Si bien desconocemos la composición y disposición espacial de la pared bacteriana de los aislados clínicos estudiados, podemos concluir que la pobre respuesta observada para el aislado M se debe al menos en parte a sus diferencias a nivel de los ligandos para TLR2 y sobre todo de los α -glucanos, puede cumplir un rol importante en la patogénesis.

Si bien se sabe muy poco sobre los mecanismos que determinan el éxito o fracaso epidemiológico de un genotipo, los resultados obtenidos en este trabajo nos acercan al menos en parte, a una posible explicación sobre la capacidad de diseminación del aislado M, logrando alta virulencia e infecciosidad a pesar de haber acumulado varias resistencias a drogas.

Nuestras observaciones son importantes para el futuro diseño de vacunas efectivas, ya que la predominancia de genotipos asociados a regiones

geográficas ha sido descripta muy recientemente y se desconoce la relevancia al respecto.

REFERENCIAS

1. Fenton, M.J. and M.W. Vermeulen 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun*, 64(3): 683-90.
2. Holt, P.G. 2005. Pulmonary dendritic cells in local immunity to inert and pathogenic antigens in the respiratory tract. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2: 116-120.
3. Balboa L, Romero MM, Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, Basile JI, Musella RM, Abbate E, de la Barrera S, Sasiain MC, Alemán M. Mycobacterium tuberculosis Impairs Dendritic Cell Response by Altering CD1b, DCSIGN and MR Profile *Immunology & Cell Biology*. 1-11, 2010
4. B. Mathema, N. E. Kurepina, P. J. Bifani, and B. N. Kreiswirth, "Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights.," *Clinical microbiology reviews*, vol. 19, no. 4, pp. 658–85, Oct. 2006
5. Ritacco, V., M. Di Lonardo, A. Reniero, M. Ambroggi, L. Barrera, A. Dambrosi, N. Isola, I. N. de Kantor. 1997. Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. *J. Infect. Dis.* 176: 637-642.
6. Palmero, D. J., M. Ambroggi, A. Brea, M. De Lucas, A. Fulgenzi, D. Martínez, C. Mosca, R. Musella, M. Natiello, C. Gonzalez, E. Abbate. 2004. Treatment and follow-up of HIV-negative multidrug-resistant tuberculosis patients in an infectious diseases reference hospital, Buenos Aires, Argentina. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8: 778-784.
7. L. Aristimuño, R. Armengol, A. Cebollada, M. España, A. Guilarte, C. Lafoz, M. A. Lezcano, M. J. Revillo, C. Martín, C. Ramírez, N. Rastogi, J. Rojas, A. V. de Salas, C. Sola, and S. Samper, "Molecular characterisation of Mycobacterium tuberculosis isolates in the First National Survey of Anti-tuberculosis Drug Resistance from Venezuela.," *BMC microbiology*, vol. 6, p. 90, Jan. 2006.
8. N. Candia, B. Lopez, T. Zozio, M. Carrivale, C. Diaz, G. Russomando, N. J. de Romero, J. C. Jara, L. Barrera, N. Rastogi, and V. Ritacco, "First insight into Mycobacterium tuberculosis genetic diversity in Paraguay.," *BMC microbiology*, vol. 7, p. 75, Jan. 2007.
9. L. C. O. Lazzarini, R. C. Huard, N. L. Boechat, H. M. Gomes, M. C. Oelemann, N. Kurepina, E. Shashkina, F. C. Q. Mello, A. L. Gibson, M. J. Virginio, A. G. Marsico, W. R. Butler, B. N. Kreiswirth, P. N. Suffys, J. R. Lapa E Silva, and J. L. Ho, "Discovery of a novel Mycobacterium tuberculosis lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil.," *Journal of clinical microbiology*, vol. 45, no. 12, pp. 3891–902, Dec. 2007.
10. N. Morcillo, A. Alito, M. I. Romano, A. Cataldi, A. Dolmann, A. Reniero, and I. N. de Kantor, "Multidrug resistant tuberculosis outbreak in Buenos Aires. DNA fingerprinting analysis of isolates.," *Medicina*, vol. 56, no. 1, pp. 45–7, Jan. 1996.

11. I. N. Ritacco, V., Reiniero, A., Ambroggi, M., Barrera, L., López, B., Di Lonardo, M. and Kantor, "Inter-hospital spread of multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires.," *Tubercle Lung Dis*, vol. 77, p. 64, 1996.
12. J. Aita, L. Barrera, A. Reniero, B. Lopez, J. Biglione, G. Weisburd, J. C. Rajmil, C. Largacha, and V. Ritacco, "Hospital transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Rosario, Argentina.," *Medicina*, vol. 56, no. 1, pp. 48–50, Jan. 1996.
13. 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.
14. 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 tuberculosis 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.
15. Kaufmann SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost..*Trends Immunol.* 26:660, 2005

ECO-EPIDEMIOLOGÍA DE LA FIEBRE AMARILLA EN EL NORTE DE ARGENTINA.

Argibay, Hernán Darío¹, Orozco, María Marcela¹, Rinas, Miguel Angel²,
Gürtler Ricardo Esteban.¹

¹Laboratorio de Eco-Epidemiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires. ²Dirección General Parque El Puma,
Ministerio de Ecología y RNR

RESUMEN

Las enfermedades emergentes y reemergentes son una de las principales amenazas actuales a la salud pública, gran parte tienen su origen en la fauna silvestre, atribuyéndose el aumento en su incidencia a los cambios ambientales que se observan a escala local, regional y global.

El estudio de reservorios silvestres y de los posibles nexos con el ciclo urbano o doméstico de estas enfermedades contribuye a los sistemas de vigilancia y al control de estas enfermedades. Incrementar la información sobre estos aspectos ayuda a comprender cuales pueden ser las vías para una eventual reemergencia. Entre 2012 y 2013 se realizaron dos relevamientos en mamíferos silvestres en cuatro fragmentos del sur de Misiones, Departamentos Capital y Candelaria donde se evaluó la exposición al virus de la Fiebre Amarilla (FA), Virus Dengue (DENV), Encefalitis de Saint Louis (SLEV) y a Virus del oeste del Nilo (WNV). Adicionalmente también se evaluó la infección por el hemoparásito *Trypanosoma cruzi*. Se invirtió un esfuerzo de captura de 2455 trampas-noche y se utilizó un rifle con dardos anestésicos y redes de niebla. Se capturaron 170 mamíferos de al menos 16 especies. Se analizaron para flavivirus mediante PCR con primers genéricos 39 individuos y serológicamente para FA 57 individuos, DENV 50 individuos, SLEV 56 individuos y WNV 56 individuos. En el caso de *T. cruzi* se analizaron 168 individuos por xenodiagnóstico (XD) y/o PCR dirigida al kinetoplasto parasitario (kDNA-PCR). Se hallaron 2 *A. caraya* positivos serológicamente a SLEV. La prevalencia de *T. cruzi* fue del 10% (intervalo de confianza del 95% (IC): 5,6-17,6%) por XD, y 11% (IC: 5,7-17,2%) por kDNA-PCR. Los animales con XD positivo incluyeron 9 (20,4%) *Di. albiventris* y 1 (7,7%) vampiro *Desmodus rotundus*, todos positivos por cultivo y kDNA-PCR. Fueron positivos solo mediante kDNA-PCR 1 murciélago frutero común *Sturnira lilium* y un *D.*

rotundus confirmados por SAT-DNA-PCR o kDNA-PCR de los contenidos rectales de las vinchucas del XD. Estos resultados confirman la ocurrencia de un activo ciclo de transmisión de *T. cruzi* en ambientes silvestres de Misiones, y por primera vez para Argentina se describe la ocurrencia de *De. rotundus* infectado por *T. cruzi* TcII e infectivo al vector *T. infestans*.

REFERENCIAS

1. Agostini I, Holzmann I, Bitetti MS Di, et al. 2014. Conservation Letter Building a Species Conservation Strategy for the brown howler monkey (*Alouatta guariba clamitans*) in Argentina in the context of yellow fever outbreaks. *Tropical conservation science* 7:26–34.
2. Agostini I, Pizzio E, De Angelo C, Di Bitetti MS. 2015. Population Status of Primates in the Atlantic Forest of Argentina. *International Journal of Primatology* [Internet] 36:244–258. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10764-015-9821-9>
3. Aguirre a a, McLean RG, Cook RS, Quan TJ. 1992. Serologic survey for selected arboviruses and other potential pathogens in wildlife from Mexico. *Journal of wild-life diseases* 28:435–442.
4. Aguirre A. 2003. *Conservation Medicine: Ecological Health in Practice*. 246 p.
5. De Almeida MAB, Dos Santos E, Da Cruz Cardoso J, et al. 2012. Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008–2009. *American Journal of Primatology* 74:68–76.
6. Bilenca D, Miñarro F. 2004. Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. Bilenca, D. y F. Miñarro. 2004. Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires.
7. Di Bitetti MS, Placi G, Dietz LA. 2003. Una visión de biodiversidad para la Ecorregión del Bosque Atlántico del Alto Paraná: Diseño de un paisaje para la conservación de la biodiversidad y prioridades para las acciones de conservación. Washington DC.
8. Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology* 30:35–44.
9. Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, et al. 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *International journal for parasitology* [Internet] 37:1319–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570369>
10. Cardinal M V., Lauricella M a., Ceballos L a., et al. 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *International Journal for Parasitology* 38:1533–1543.
11. Collias N, Southwick C. 1952. Field study of population density and social organization in howling monkeys. *Proceedings of the American Philosophical Society* 90:143–155.

12. Contigiani MS, Fernandez C, Spinsanti LI, Diaz GE. 2000. Prevalencia de anticuerpos para flavivirus en el primate *Alouatta caraya* autoctono de la Argentina. *Medicina* 60:348–350.
13. Da Costa Vasconcelos PF. 2003. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36:275–293.
14. Curado I, dos Santos Malafronte R, de Castro Duarte AMR, et al. 2006. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Acta Tropica* 100:54–62.
15. Daszak P. 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife-- Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* [Internet] 287:443–449. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/287/5452/443>
16. Diaz HF, McCabe GJ. 1999. A Possible Connection between the 1878 Yellow Fever Epidemic in the Southern United States and the 1877 – 78 El Niño Episode. *Bulletin of the American Meteorological Society* 80:21–28.
17. Duarte AMRDC, Porto M a L, Curado I, et al. 2006. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. *Journal of Medical Primatology* 35:87–96.
18. Garcia JL, Svoboda WK, Chryssafidis AL, et al. 2005. Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in wild New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Paraná State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 133:307–311.
19. Garnett GP, Holmes EC. 1996. The ecology of emergent infectious disease. *BioScience* 46.
20. Gillespie TR, Chapman C a. 2006. Prediction of parasite infection dynamics in primate metapopulations based on attributes of forest fragmentation. *Conservation Biology* 20:441–448.
21. Goldberg TL, Gillespie T, Rwego I. 2008. Health and disease in the people, primates, and domestic animals of Kibale National Park: implications for conservation. *Science and conservation in African forests: the benefits of long-term research*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom [Internet]:75–87. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Health+and+disease+in+the+people,+primates,+and+domestic+animals+of+Kibale+National+Park:+implications+for+conservation#0>
22. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. 2002. Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases* 8:1468–1473.
23. Higo H, Miura S, Horio M, et al. 2004. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitology international* [Internet] 53:337–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464443>
24. Holzmann I, Agostini I, Areta JI, et al. 2010. Impact of yellow fever outbreaks on two howler monkey species (*Alouatta guariba clamitans* and *A. caraya*) in Misiones, Argentina. *American Journal of Primatology* 72:475–480.
25. Kowalewski MM, Gillespie TR. 2009. Ecological and Anthropogenic Influences on Patterns of Parasitism in Free-Ranging Primates: A Meta-analysis of the Genus *Alouatta*. In: *South American Primates*, p 157–189. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-78705-3>

26. Kowalewski MM, Salzer JS, Deutsch JC, et al. 2011. Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: Patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. *American Journal of Primatology* 73:75–83.
27. KUMM HW, LAEMMERT HW. 1950. The geographical distribution of immunity to yellow fever among the primates of Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* [Internet] 30:733–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14771397>
28. Marcili a, Lima L, Cavazzana M, et al. 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* 136:641–655.
29. Michaud C, Tantalean M, Ique C, Montoya E, Gozalo A. 2003. A survey for helminth parasites in feral New World non-human primate populations and its comparison with parasitological data from man in the region. *Journal of Medical Primatology* [Internet] 32:341–345. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1600-0684.2003.00037.x>
30. Miles M a, Llewellyn MS, Lewis MD, et al. 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 136:1509–1528.
31. Milton K, Lozier JD, Lacey E a. 2009. Genetic structure of an isolated population of mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*) on Barro Colorado Island, Panama. *Conservation Genetics* 10:347–358.
32. Morales M, Fabbri C, Luppó V, et al. 2011. Estudio de la actividad de flavivirus en *Alouatta caraya* del noreste de Argentina. In: X Congreso Argentino de Virología, III Simposio Argentino de Virología Clínica, III Encuentro Latinoamericano de Virólogos, I Simposio de Virología Veterinaria. Sociedad Argentina de Virología.
33. Moureau G, Cook S, Lemey P, et al. 2015. New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences. *PloS one* [Internet] 10:e0117849. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0117849>
34. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews. Microbiology* [Internet] 3:13–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1067>
35. Nobre A, Antezana D, Tauil PL. 1994. Febre amarela e dengue no Brasil: epidemiologia e controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27:59–66.
36. Noireau F, Diosque P, Jansen AM. 2009. *Trypanosoma cruzi*: Adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research* 40.
37. Ostfeld RS, Keesing F, Eviner VT. 2008. Infectious disease ecology: the effects of ecosystems on disease and of disease on ecosystem. (Ostfeld RS, Keesing F, Eviner VT, editors.). New Jersey: Princeton University Press. 506 p.
38. Patz J a., Daszak P, Tabor GM, et al. 2004. Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environmental Health Perspectives* 112:1092–1098.
39. Quaglia AI, Diaz LA, Argibay H, Contigiani MS, Saggese MD. 2014. West Nile

- and St. Louis Encephalitis Viruses Antibodies Surveillance in Captive and Free-Ranging Birds of Prey from Argentina. *EcoHealth*.
40. Rocha FL, Roque ALR, de Lima JS, et al. 2013. Trypanosoma cruzi Infection in Neotropical Wild Carnivores (Mammalia: Carnivora): At the Top of the T. cruzi Transmission Chain. *PLoS ONE* 8.
 41. Schrag SJ, Wiener P. 1995. Emerging infectious disease: what are the relative roles of ecology and evolution? *Trends in Ecology & Evolution* [Internet] 10:319–324. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534700891181>
 42. Schweigmann NJ, Pietrokovsky S, Bottazzi V, et al. 1999. Estudio de la prevalencia de la infección por Trypanosoma cruzi en zarigüeyas (Didelphis albiventris) en Santiago del Estero, Argentina. *Revista Panamericana de Salud Pública* 6:371–377.
 43. Svoboda WK, Martins LC, Malanski L de S, et al. 2014. Serological evidence for Saint Louis encephalitis virus in free-ranging New World monkeys and horses within the upper Paraná River basin region, Southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [Internet] 47:280–286. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822014000300280&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 44. Tibayrenc M. 2003. Genetic subdivisions within Trypanosoma cruzi (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid biology and disease* 2:12.
 45. Travi BL, Colillas OJ, Segura EL. 1986. Natural Trypanosome infection in Neotropical monkeys with special reference to Saimiri sciureus. *Current Perspectives in Primate Biology*:296–306.
 46. Vargas-Mendez O, Elton NW. 1953. Naturally acquired yellow fever in wild monkeys of Costa Rica. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2:850–863.
 47. Vasconcelos PF, Travassos da Rosa A P, Rodrigues SG, et al. 2001. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica* 17 Suppl:155–164.
 48. Vaz VC, D'Andrea PS, Jansen A M. 2007. Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by Trypanosoma cruzi. *Parasitology* 134:1785–1793.
 49. Viglizzo EF, Frank FC, Carreño L. 2006. Ecorregiones Pampa y Campos y Malezales. *La Situación Ambiental Argentina 2005*:261–278.
 50. Volney B, Pouliquen JF, De Thoisy B, Fandeur T. 2002. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. *Acta Tropica* 82:11–23.
 51. Wobeser G. 2002. New and emerging diseases--the wildlife interface. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 43:798.
 52. Wolfe ND, Dunavan CP, Diamond J. 2007. Origins of major human infectious diseases. *Nature* 447:279–283.
 53. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, et al. 2009. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:1051–1054.

54. Zingales B, Miles M a., Campbell D a., et al. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet] 12:240–253. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>

Publicaciones y Presentaciones a congresos que surgieron de este trabajo:

- Argibay HD, Orozco MM, Rinas MA, Cardinal MV, Gürtler RE. Nuevas especies de murciélagos como potenciales reservorios de *Trypanosoma cruzi* en el nor-este de Argentina. II Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Epidemiología Veterinara y Medicina Preventiva. 5 al 7 de noviembre 2015., Buenos Aires, Argentina
- Argibay HD, Orozco MM, Rinas MA, Cardinal MV, Gürtler RE. “*Trypanosoma cruzi* en áreas naturales de Misiones”. III Congreso Panamericano de Zoonosis, VIII Congreso Argentino de Zoonosis. 4 al 6 de junio 2014. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Argibay, HD; Orozco, MM.; Rinas, MA; Cardinal, MV.; Gürtler, RE. “Vampiros y zarigüeyas como hospedadores silvestres de *Trypanosoma cruzi* en el nordeste de Argentina”. XXVI Jornadas Argentinas de Mastozoología. SAREM. 5 al 8 de noviembre 2013 Mar del Plata, Argentina.

ABSTRACT

Emerging and re-emerging diseases are one of the main threats to public health nowadays. Most of them are originated in wildlife, ascribing the increase in the incidence of emerging disease to environmental changes that occurs at local, regional and global scale.

The study of wild reservoirs and the potential nexus with urban transmission cycles of emerging and re-emerging these diseases contribute to surveillance and control of it. Increase the information about these aspects aids to understand which can be the ways to an eventual re-emergence. In 2012 and 2013 two surveys in wild mammals were conducted in four fragments in southern Misiones Province, Capital and Candelaria Departments. In these surveys we assessed the exposition to Yellow Fever Virus (YF), Dengue Virus (DENV), Saint Louis Encephalitis Virus (SLEV) and West Nile Virus (WNV). Additionally we also assessed the infection of the hemoparasite *Trypanosoma cruzi*. We invested a capture effort of 2455 night-traps and we also used anaesthetic darts for primates and mist nets for bats. 170 mammals were captured of at least 16 different species. Were analysed for flavivirus by PCR with

generic primers 39 mammals and by serology specific for YFV 57, DENV 50, SLEV 56 and WNV 56 mammals. For *T. cruzi* were analysed 168 mammals by xenodiagnosis (XD) and/or polymerase chain reaction amplification of the hyper-variable region of kinetoplast DNA minicircles of *T. cruzi* (kDNA-PCR). Two *Alouatta caraya* were positive by serology to SLEV. The overall prevalence of *T. cruzi* infection was 10% (95% confidence interval (CI), 5,6-17,6%) by XD, and 11% (CI: 5,7-17,2%). Infected animals included 9 (20,4%) *Didelphis albiventris* and one (7,7%) *Desmodus rotundus*, all positive both by XD and kDNA-PCR, and 1 *D. rotundus* and 1 *Sturnira lilium* were positive by kDNA-PCR and further corroborated by SAT-DNA-PCR or by kDNA-PCR of the xenodiagnostic bugs rectal contents. These results confirms the occurrence of two different *T. cruzi* transmission cycles in sylvatic environments of Misiones Province and is reported for the first time to Argentina the occurrence of a *De. rotundus* infected with TcII and with infectiousness to *T. infestans*.

EFICACIA DE LA ACTIVIDAD FÍSICA MODERADA EN LA PREVENCIÓN DEL AUMENTO DE PESO DURANTE EL TRATAMIENTO DE LA ADICCIÓN AL TABACO EN PACIENTES ASISTIDOS EN UN CONSULTORIO DE CESACIÓN TABÁQUICA DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES: ENSAYO RANDOMIZADO Y CONTROLADO.

Armaleo, MV

Hospital de Clínicas “José de San Martín”, consultorio de cesación tabáquica.

INTRODUCCIÓN

El tabaquismo es considerado como la primera causa mundial de muertes prevenibles. Cada año origina cerca de 6 millones de defunciones y causa pérdidas económicas en todo el mundo. Los países de menores ingresos presentan la mayoría de esas muertes, proyecciones de la OMS señalan que esta disparidad aumentará en los próximos decenios.¹

Nuestro país no queda exento de dicha problemática. La Segunda Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2009 reportó una prevalencia de 27,1% en adultos mayores de 18 años. Se estima que el tabaco causa 824.804 años de vida saludables (AVISA) perdidos y alrededor de 40.000 muertes por enfermedades relacionadas con su consumo.² Estas enfermedades están entre las primeras causas de muerte, siguiendo estadísticas del INDEC para el año 2008, las enfermedades cardiovasculares encabezaban la lista con el 29,9%, seguida de los tumores 18,9% y las enfermedades del aparato respiratorio con el 14,4%.³

Dejar de fumar prolonga la vida y reduce la morbilidad.⁴ El tratamiento de la adicción al tabaco no sólo es clínicamente efectivo, sino que también es costo-efectivo. Actualmente se lo considera como el patrón de referencia de costo efectividad en asistencia sanitaria, comparado, inclusive, con el tratamiento de la hipertensión.⁴ Es por esta razón que la OMS aconseja la optimización en la disponibilidad y acceso a los servicios de cesación como una medida de eficacia comprobada destinada a reducir el consumo de tabaco en un país.⁵

Uno de los principales obstáculos del tratamiento de esta adicción es la ganancia de peso que se produce luego de la cesación. Alrededor del 50% de las mujeres y 26% de los varones manifiestan preocupación por este motivo

y los desalienta a iniciar el tratamiento. Estudios prospectivos estimaron que el promedio de ganancia de peso post cesación es de alrededor de 3 a 5 Kg., sin embargo, aproximadamente el 10% de los pacientes podría sufrir una ganancia de peso mayor a 13 kg.⁶

La actividad física podría moderar algunas de las consecuencias negativas del abandono del cigarrillo. La evidencia indica que la participación en la actividad física regular incrementa el gasto calórico, disminuye la ingesta, reduce los síntomas de abstinencia, disminuye los síntomas de depresión, ansiedad y stress psicológicos asociados a este proceso.⁷ También mejoraría la habilidad de enfrentar los síntomas de abstinencia y la autoestima, ambos factores involucrados en la prevención de recaídas.⁸

Diferentes ensayos demostraron individualmente la eficacia del ejercicio intenso incorporado al tratamiento de cesación tabáquica.^{7,9,10} Más recientemente, se publicaron algunos estudios acerca de la incorporación de la actividad física moderada con resultado dispar. En el año 2008, una revisión sistemática que incluyó 13 ensayos halló que solamente tres de ellos mostraron porcentajes de abstinencia significativos en el grupo intervención.¹⁰ Otra revisión sistemática realizada para evaluar estrategias dirigidas a disminuir la ganancia de peso post cesación, muestra que las intervenciones con ejercicios físicos podrían contribuir al descenso de peso a largo plazo.¹¹

A pesar de la probada costo efectividad de los tratamientos de la adicción tabáquica, la mayoría de los intentos de cesación se realizan sin asistencia médica.¹⁰ El porcentaje de éxito de estos intentos es bajo: se calcula que sólo alrededor del 2 al 4% de los fumadores alcanzan una cesación exitosa al año. No obstante, los intentos de cesación asistidos asociados a la terapia farmacológica pueden duplicar o triplicar las tasas de éxito.⁴ Aún así, ellas permanecen bajas comparadas con otros tipos de tratamientos. Por lo que es necesario el desarrollo de intervenciones más efectivas que contemplen diversos aspectos de este complejo proceso. Se carece de evidencia local.

PACIENTES Y METODOS

Nuestra población objetivo fueron personas de ambos sexos autodefinidas como fumadoras. Hemos tomado la definición clásica que define como fumador a toda aquella persona que fuma en el momento de la consulta y que refiere haber fumado, al menos, 100 cigarrillos en toda su vida.

La unidad de análisis fue cada paciente entre 18 y 65 años, sedentarios, autodefinidos como fumadores, asistidos en el Consultorio de Cesación Tabáquica del Programa de Medicina Interna General del Hospital de Clínicas que fumaran 10 o menos cigarrillos por día en el momento de la primera entrevista. Fueron invitados a participar aquellos pacientes que pudieran hablar, leer y comprender el idioma español, sean capaces de separarse de sus acompañantes, no estuvieran demasiado enfermas para participar que cumplan los criterios de inclusión, que no presente contraindicaciones para realizar actividad física (mencionada en criterios de exclusión) y que acepte el consentimiento informado.

UNIDAD DE ANÁLISIS, CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Pacientes fumadores de ambos sexos, entre los 18 y los 65 años que fumen 10 o menos cigarrillos por día y sedentarios. Será considerado como sedentario a todo aquel paciente que refiera realizar algún tipo de actividad física menor a 90 minutos semanales. Los criterios de exclusión incluirán a aquellos problemas médicos o uso de medicación que puedan alterar la tolerancia o la realización de ejercicios de intensidad moderada, enfermedades psiquiátricas, abuso de sustancias, el uso concomitante de medicación para el tratamiento de la dependencia al tabaco y pacientes embarazadas.

Se realizará un muestreo sistemático, asignándose en forma aleatoria el inicio en el listado de pacientes y luego se seleccionarán los individuos a un intervalo especificado previamente.

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó el programa Epidat 4.00 y se asumió que el peso corporal tendría una distribución gaussiana. Se estimó que una muestra de 50 pacientes (25 por grupo) tendría un poder del 80% y un error alfa de 0,05 para detectar una diferencia promedio de 2,07 kg con un DS de 1,71 ($\delta = 0.820$), asumiendo que las varianzas son iguales y siguiendo datos de literatura previa ¹¹. A dicho valor se le sumará un 20% (10 pacientes para toda la muestra) para la compensación de probables pérdidas en el seguimiento de pacientes.

Fueron invitados a participar a todos aquellos pacientes que cumplan los criterios de inclusión durante las primeras consultas. Se obtuvieron datos demográficos y relacionados con la conducta adictiva del paciente que se registraron en una base de datos confeccionada para tal fin. También se obtuvieron medidas antropométricas como peso, talla, circunferencia de la cintura, pliegue cutáneo y medición del CO en aire espirado.

Se realizó la asignación al grupo control o intervención de manera aleatoria. Todos los pacientes participaron de un programa de cesación tabáquica consistente en técnicas cognitivo conductuales basados en la evidencia. Dicho programa consiste en sesiones semanales, un total de 8, de 30 minutos de duración cada una, en las cuales se desarrollan tópicos como control de estímulo, manejo del stress, manejo de los síntomas de abstinencia, identificación de las situaciones gatillo, automonitoreo, técnicas de relajación y dieta saludable. Para asegurar que la administración del programa sea estandarizado se entregó material de autoayuda (Cómo dejar de fumar. Módulo II Voy a intentarlo) diseñado por el Programa Nacional de Control del Tabaco del Ministerio de Salud de la Nación.²⁰ Todos los miembros del consultorio de cesación tabáquica del PMIG fueron los encargados de liderar los encuentros realizados en el PMIG. En cada encuentro se interrogó sobre consumo de tabaco y se midió el CO en aire espirado.

La actividad física moderada (Plan de Ejercicios) que se le propuso al grupo intervención consiste en una serie de 10 ejercicios con una relación de 80% de aeróbicos y 20% anaeróbicos. Los ejercicios aeróbicos mencionados son aquellos que involucran grandes grupos musculares, para una provisión de oxígeno a las zonas musculares que participan, y los anaeróbicos para mejorar el tono muscular, éstos son realizados contra carga o resistencia.

Para un mejor desarrollo del Plan de Ejercicios se tendrá en cuenta:

Frecuencia: La frecuencia establecida debe ser diaria, es decir adoptada como forma del estilo de vida, o sea todos los días.

Intensidad: se evaluará siguiendo la fórmula de la frecuencia cardíaca máxima (FCM) = F.C.M. = 220 - edad. Se utilizará un rango del 50% al 85% de la F.C.M. Si se comienza con un 50% a 55% se aumentará 5% la intensidad cada 21 días de acuerdo a la mejoría de la capacidad física subjetiva (lo informa el paciente).

Tiempo: se recomienda de 30 a 45 minutos por día, y cada 15 días aumentar el tiempo 5 minutos.

El plan de ejercicios consta de una Planilla de Control para evaluar la adherencia de los Ejercicios recomendados. Falta agregar que este tipo de actividad física tiene raramente algún tipo de contraindicación médica.²¹

El grupo intervención fue invitado a participar en una serie de encuentros semanales hasta la finalización del tratamiento a las 12 semanas. Durante el primer encuentro se le entregó a cada paciente un instructivo (Plan de Ejercicios) sobre la actividad física a incorporar. La práctica de cada paciente fue supervisada semanalmente por una profesora de Educación Física (Prof. Carolina Recalde), quien se desempeñó en el servicio de Nutrición del Hospital de Clínicas. Los pacientes fueron instruidos acerca de la necesidad de realizar los ejercicios en forma diaria y completar una planilla de control que se le entregará para tal fin.

Se tomaron las medidas antropométricas quincenalmente y se consignaron en la base de datos.

RESULTADOS

Se realizaron campañas de difusión compuesta de notas radiales, gacetillas en periódicos y cartelería no solo en el servicio de PMIG sino en todo el hospital alertando de los riesgos del tabaquismo en general y haciendo foco en los riesgos de fumar 10 o menos cigarrillos por día y los beneficios que trae a la salud en general realizar actividad física moderada. Esto ayudó a aumentar el número de pacientes atendidos en el consultorio de cesación tabáquica, pero a pesar de ello, solo dos pacientes dieron su consentimiento informado para participar del estudio.

Un paciente de sexo masculino fue el único en el grupo control. El mismo logró realizar el tratamiento solo con las técnicas indicadas para su grupo, sin uso de medicación para la cesación tabáquica. Por otro lado, una paciente de sexo femenino fue la integrante del grupo intervención, pero solo logró presentarse en dos consultas con la profesora Recalde y a dos con el equipo del PMIG. Luego de tratar insistentemente de ponernos nuevamente en contacto con la paciente, se la dio por perdida.

Se concluye que los datos no son estadísticamente significativos ya que no se pudo alcanzar el tamaño muestral necesario.

BIBLIOGRAFIA

1. Organización Mundial de la Salud. Informe OMS sobre la Epidemia Mundial de Tabaquismo, 2011. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240687813eng.pdf>

2. Min. de Salud de la Nación. 2º Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. 2009. Bs As, Argentina. http://www.msal.gov.ar/ent/PDF/resumen_ejecutivo_ENFR.pdf
3. INDEC. Tasa de mortalidad total años 2005-2008. http://www.indec.gov.ar/principal.asp?id_tema=66
4. Fiore M. Treating Tobacco Use and Dependence: 2008. Update. U.S. Department of Health and Human Services http://www.ahrq.gov/clinic/tobacco/treating_tobacco_use08_sp.pdf
5. World Health Organization. Gender and Tobacco Control. 2007 http://www.who.int/tobacco/resources/publications/general/policy_brief.pdf
6. Spring B. Behavioral intervention to promote smoking cessation and prevent weight gain: systematic review and meta-analysis. *Addiction*. 2009 September; 104(9): 1472-1486. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2728794/pdf/nihms117064.pdf>
7. Marcus B. Rationale, design, and baseline data for Commit to Quit II: an evaluation of the efficacy of moderate-intensity physical activity as an aid to smoking cessation in women. *PrevMedicine* 36 (2003) 479–492. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649057>
8. **Prapavessis H.** The effects of exercise and nicotine replacement therapy on smoking rates in women. *Addict Behav.* 2007;32 (7):1416-1432 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17097814>
9. Marcus B. The Efficacy of Exercise as an Aid for Smoking Cessation in Women. *Arch Intern Med.*1999; 159:1229-1234. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10371231>
10. Ussher MH. Exercise interventions for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Oct 8;(4):CD002295. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843632>
11. Parsons AC. Interventions for preventing weight gain after smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009 Jan 21;(1):CD006219. <http://www2.cochrane.org/reviews/en/ab006219.html>
12. Foro de Investigaciones en Salud de Argentina. Resumen Ejecutivo: Estado de conocimiento y agenda de prioridades para la toma de decisiones en tabaquismo en Argentina. 2007 www.saludinvestiga.org.ar/pdf/policy-brief/Tabaquismo.pdf
13. Bruni J. Costos directos de la atención médica de las enfermedades atribuidas al tabaco en Argentina. Programa Nacional de Control de Tabaco. Ministerio de Salud. 2005
14. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud. Ginebra. 2004 http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_spanish_web.pdf
15. Prochaska JJ. Physical Activity as a Strategy for Maintaining Tobacco Abstinence: A Randomized Trial. *Prev Med.* 2008; 47(2) 215–220. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2536696/>
16. Marcus BH. The efficacy of moderate-intensity exercise as an aid for smoking cessation in women: A randomized controlled trial. *Nicotine Tob Res* 2005;7(6): 871–880 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16298722>
17. West R. Assessing smoking cessation performance in NHS Stop Smoking Services. The Russell Standard. NHS Stop Smoking Service. Service and monitor-

- ing guidance 2009/10 http://www.pcc.nhs.uk/uploads/commissioning/2010/07/f_smoking.pdf
18. Braun S. Tobacco industry targeting youth in Argentina. *Tob Control*. 2008 Apr;17(2):111-7.
 19. <http://tobaccocontrol.bmj.com/content/17/2/111.abstract>
 20. Braun S. Tobacco advertising and press coverage of smoking and health in 10 years of Argentinean newspapers. *CVD Prev Control* (2011), doi:10.1016/j.cvd-pc.2011.04.002.
 21. Programa Nacional de Control del Tabaco. Ministerio de Salud de la Nación. Manual de autoayuda. Módulo 2: voy a intentarlo. http://msal.gov.ar/htm/site_tabaco/pdf/modulo2.pdf
 22. American College of Sports Medicine. (2010). *ACSM's guidelines for exercise testing and prescription* (8th ed.). Philadelphia, PA: Lippincott, Williams, & Wilkins.

VIGILANCIA AMBIENTAL DE VIRUS ENTÉRICOS EN MATRICES ACUOSAS DE CÓRDOBA, ARGENTINA

Cuadrado PR, Fernández MN, Martínez LC, Giordano MO, Masachessi G, Isa MB, Nates SV, Barril PA.

Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

RESUMEN

La contaminación fecal del agua es un problema preocupante ya que está asociado con la transmisión de microorganismos entéricos patógenos que pueden causar numerosas enfermedades infecciosas. En este estudio se llevó a cabo un monitoreo ambiental para conocer el patrón de circulación y diversidad de cepas circulantes de rotavirus en la población de Córdoba, evaluar el nivel de contaminación viral de las aguas recreacionales de los ríos Suquía y Xanaes de la Provincia de Córdoba, y estimar el riesgo de infección por rotavirus por contacto con estas aguas superficiales. Para esto, se realizó un muestreo de efluentes cloacales en la planta depuradora de la ciudad de Córdoba y en las aguas superficiales de los ríos Suquía y Xanaes durante un período de un año. Se determinó la presencia de coliformes totales y fecales mediante el método del número más probable y posteriormente las aguas fueron concentradas por precipitación con polietilenglicol para realizar las determinaciones virales. Los concentrados virales se amplificaron en cultivos de células Hep-2 y se identificó la presencia de enterovirus viable por inmunofluorescencia indirecta. Asimismo, los concentrados virales fueron analizados por técnicas moleculares de RT-nested PCR y PCR en tiempo real para detectar, caracterizar genotípicamente y cuantificar la concentración de rotavirus. Finalmente, se estimó el riesgo de infección por rotavirus mediante modelo de dosis-respuesta de β -Poisson y simulación de Monte Carlo. El monitoreo de aguas residuales reveló la circulación continua de rotavirus en la población local, siendo la variante genotípica dominante G1P[8]. Se observó una tendencia de mayor circulación viral en las estaciones frías (especialmente a temperaturas inferiores a 18°C, $P \leq 0.05$) y secas (aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, $P = 0.15$). La humedad relativa ambiente no mostró relación con la concentración de rotavirus

($P=0.93$). En relación a la calidad bacteriológica de las aguas superficiales, en el Río Suquía se observaron niveles de bacterias coliformes generalmente superiores a los límites establecidos para calidad de aguas recreacionales, mientras que el Río Xanaes exhibió un menor nivel de contaminación bacteriana, con niveles de coliformes frecuentemente dentro de los valores guía. En relación a la contaminación viral, se detectó la presencia frecuente de enterovirus viable (78.6% en Suquía y 87.5% en Xanaes) y genoma de rotavirus (100% en Suquía y 18.7% en Xanaes). La concentración media de rotavirus fue de 5.7×10^5 cg/L en el Río Suquía y 8.5×10^0 cg/L en el Río Xanaes. El análisis cuantitativo de riesgo microbiológico reveló un elevado riesgo de transmisión hídrica de rotavirus en el Río Suquía, en sitios de monitoreo con calidad aceptable y no aceptable de bacterias indicadoras, mientras que el Río Xanaes mostró un riesgo de infección significativamente menor. No se observó relación entre la presencia de bacterias indicadoras y la detección de virus entéricos, lo que indica que el monitoreo de virus debería incluirse en la determinación de la calidad microbiológica de aguas. La detección de genoma de rotavirus y enterovirus viable en las aguas recreacionales de Córdoba representa un riesgo para la salud de la población expuesta y alerta sobre los usos de estas aguas.

ABSTRACT

An environmental survey was conducted to determine the pattern of rotavirus circulation in the population of Cordoba, to assess the level of viral contamination of the Suquia and Xanaes rivers in the Province of Córdoba, and to estimate the risk of rotavirus infection by contacting the surface waters. A one-year monitoring of local raw sewage and surface waters was carried out. The presence of coliform bacteria was determined and water samples were then concentrated for viral determination. Cell culture and indirect immunofluorescence were applied for enterovirus detection, RT-nested PCR and qPCR for rotavirus detection, characterization and quantification and β -Poisson modeling/Monte Carlo simulation for quantitative microbiological risk assessment (QMRA) of rotavirus infection. Raw sewage analysis revealed that rotavirus circulated in the local community all year round. However, a slight trend for rotavirus circulation was noted during the colder and drier months, but it was not related with variations in the ambient relative humidity. Coliform bacteria levels were found in Suquia River often far exceeding the guideline

limits for recreational waters. The Xanaes exhibited a lower level of bacterial contamination, frequently within the guideline limits. Enteric viruses were frequently detected in the Suquia (78.6% enterovirus, 100% rotavirus) and Xanaes rivers (87.5% enterovirus, 18.7% rotavirus). Rotavirus was detected at a media concentration of 5.7×10^5 gc/L in the Suquia and 8.5×10^0 gc/L in the Xanaes. QMRA revealed high risk of rotavirus infection in the Suquia, at sampling points with acceptable and non-acceptable bacteria numbers, while the Xanaes showed significantly lower health risk of rotavirus infection. The viral occurrence was not readily explained by the levels of bacteria indicators, thus viral monitoring should be included to determine microbiological water quality. The detection of rotavirus and enterovirus in the recreational waters reveals a health risk to the exposed population and alerts about the waters uses.

EVALUACIÓN DE LA MASA ÓSEA EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA

Brance ML, Brun LR, Lioi S, Sánchez A, Abdala M, Oliveri B.

Servicio de Reumatología. Hospital Provincial del Centenario y Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario

SÍNTESIS FINAL

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica crónica común inflamatoria autoinmune. El tejido sinovial en pacientes con AR se caracteriza por hiperplasia y células inflamatorias que producen mediadores proinflamatorios y proteasas que afectan cartílago y el hueso. La AR lleva a la destrucción progresiva de las articulaciones afectadas, deformación y discapacidad progresiva. Evidencias previas indican una asociación entre la deficiencia de vitamina D y un aumento de la incidencia de enfermedades autoinmunes. El objetivo de este estudio fue evaluar la masa ósea y los niveles de 25(OH)D y evaluar si los niveles de 25(OH)D correlacionaban con la actividad de la AR y el estado de salud en pacientes con AR.

Se estudiaron 42 mujeres que cumplían los criterios de clasificación ACR 2010 de AR y 48 voluntarias sanas como grupo control. Fueron incluidos pacientes mujeres del Servicio de Reumatología del Hospital Provincial del Centenario de Rosario mayores de 18 años, con AR diagnosticada al menos 1 año antes. Los pacientes fueron excluidos si tenían una historia previa de neoplasia o habían tomado medicamentos que afectaban el metabolismo óseo, incluyendo los bifosfonatos, calcio y suplementos de vitamina D en los últimos 12 meses, o estaban recibiendo GC oral (> 10 mg/día de prednisona o equivalente) en los últimos 3 meses.

Se realizaron determinaciones de metabolismo mineral, dosaje de 25(OH)D, PTH, se realizó DMO, radiografías de manos, pies, columna dorsal y lumbar. En el examen físico se evaluó actividad de la enfermedad por DAS-28. Al año se midió nuevamente niveles de vitamina D y DAS-28 luego de la suplementación con vitamina D según niveles plasmáticos.

Las pacientes con diagnóstico de AR presentaron menores niveles de 25(OH)D (20.4 ± 0.9 ng/ml) que los pacientes controles (26.3 ± 1.9 ng/ml;

$p < 0.05$). Aunque no se encontró una correlación lineal entre los niveles de 25(OH)D y el score de actividad de la enfermedad (DAS-28), los pacientes con actividad moderada y alta tenían niveles más bajos de 25(OH)D que aquellos con baja actividad: DAS-28 > 3.2 : 19.5 ± 0.88 ng/ml; DAS-28 ≤ 3.2 : 23.7 ± 2.8 ng/ml ($p = 0.047$). Después de una año de tratamiento con vitamina D los niveles de 25(OH)D aumentaron y el DAS-28 disminuyó ($n = 25$; $p < 0.05$).

No se encontraron diferencias en la DMO en columna lumbar entre mujeres premenopáusicas (preM) o postmenopáusicas (postM) aunque la DMO en cuello femoral fue significativamente más baja en pacientes postmenopáusicas con diagnóstico de AR (T-score -2.5 ± 0.4) respecto de controles postM (T-score -0.9 ± 0.3 , $p = 0.014$).

Como conclusión los pacientes con AR tuvieron niveles más bajos de 25(OH)D que los pacientes del grupo control. Bajos niveles de 25(OH)D fueron asociados con moderada y alta actividad de la enfermedad sugiriendo la importancia de que los pacientes con AR presenten niveles plasmáticos óptimos. La DMO de cuello femoral fue más baja en pacientes postM AR. No se encontraron diferencias en la DMO de columna lumbar en pacientes preM y postM con AR, sugiriendo que la evaluación de la masa ósea en pacientes con AR debería incluir cuello femoral a pesar de la edad del paciente.

Palabras clave: vitamina D, masa ósea, artritis reumatoidea, actividad de la enfermedad.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory autoimmune disease with high prevalence of osteoporosis. Previous evidence indicates an association between vitamin D deficiency and autoimmune diseases. The aim of this study was to evaluate serum 25 hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels, bone mineral density (BMD) and disease activity in RA patients living in Argentina. We studied 34 RA women and 41 healthy women as a control group. RA patients had lower 25(OH)D levels (20.4 ± 0.9 ng/ml) than controls (26.3 ± 1.9 ng/ml; $p < 0.05$). No significant differences were found in lumbar spine BMD between premenopausal (preM) or postmenopausal (postM) patients, but femoral neck BMD was significantly lower in postM RA patients (T-score -2.5 ± 0.4) than in postM control subjects (T-score -0.9 ± 0.3 , $p = 0.014$). Although no linear correlation between 25(OH)D levels and disease activity (DAS-28) was found, patients with moderate-high disease activity had lower

25(OH)D levels than those with low disease activity: DAS-28 >3.2: 19.5 ± 0.88 ng/ml; DAS-28 ≤ 3.2 : 23.7 ± 2.8 ng/ml ($p=0.047$). After 1 year of vitamin D treatment 25(OH)D levels were increased while DAS-28 were decreased ($n=25$; $p<0.05$). We conclude that patients with RA had lower 25(OH)D levels than the control group. Low levels of 25(OH)D were associated with moderate-high disease activity suggesting the importance of optimal 25(OH)D levels in RA patients. Femoral neck BMD was lower in postM RA patients. No differences in lumbar BMD were found between preM and postM RA patients, suggesting that bone mass evaluation in RA patients should include femoral neck BMD regardless of age.

Keywords: vitamin D; bone mass; rheumatoid arthritis; disease activity.

ESTUDIO DE DELECCIONES EN EL GEN FMR2 COMO CAUSA DE FALLA OVÁRICA PREMATURA

Noemí Buzzalino, Lucía Espeche, Andrea Solari
Centro Nacional De Genética Médica “Dr. Eduardo Castilla”,
ANLIS “Carlos G. Malbrán”.

La falla ovárica prematura (FOP) es una disfunción ovárica que se define por la presencia de amenorrea primaria o secundaria (de al menos 4 meses) antes de los 40 años. Tiene un perfil característico con niveles altos de gonadotrofinas y bajos de andrógenos y la presencia de distintos grados de atresia folicular ¹. El diagnóstico se confirma por dos dosajes de FSH en sangre con un mes de separación. Esta patología afecta al 1% de las mujeres en edad fértil^{2,3}. Entre las mujeres con cariotipo normal (46,xx) se estimó una incidencia de alrededor de 1:1000 para las menores de 30 años, 1:250 para las de 35 y de 1:400 para las de 40. y presenta patogénesis multicausal. La presencia de varias afectadas en una familia ha sugerido un origen genético ^{4,5}. Algunos estudios han hallado mutaciones en genes relacionados con la función ovárica, como el receptor de FSH ^{6,7} y la subunidad α de la Inhibina ^{8,9}. Sin embargo, en otras poblaciones (incluida la nuestra) no se ha podido demostrar la presencia de mutaciones en afectadas por FOP o un aumento del riesgo de desarrollar la patología al analizar la presencia de variantes polimórficas ¹⁰⁻¹⁸. La detección de mutaciones en casos aislados de FOP, no sólo para los genes ya mencionados, sino también para otros analizados ¹⁹⁻²¹ indicaría que probablemente, es una enfermedad muy heterogénea en lo que a variantes genéticas se refiere. Uno de los genes involucrados, es el gen FMR1 (locus FRAXA), responsable del síndrome de fragilidad del X, que se produce como resultado de la expansión del número de repeticiones de un triplete CGG polimórfico ubicado en la región 5' no traducible del mismo. El número normal de repeticiones se encuentra entre 5 y 50. El llamado estado de premutación se define entre 50-200 repeticiones que se caracterizan por presentar una marcada inestabilidad en su tamaño durante la transmisión a la descendencia por vía materna. Se han descrito también los alelos llamados intermedios o zona gris⁽⁴⁵⁻⁵⁴⁾ que no causan en síndrome de fragilidad del x, pero que sin embargo, en un 14% de los casos se los considera inestables

y pueden expandir al rango de premutación cuando son transmitidos por la madre. Por otro lado, el estado de mutación completa se da cuando se alcanza un número de repeticiones mayor a 200. Esto coincide con la metilación del promotor, el gen se silencia y el déficit de la proteína causa el retardo mental y el resto de las características clínicas del síndrome²². Cronister y col²³ fueron los primeros autores que sugirieron la frecuencia de FOP era mayor entre las mujeres portadoras de la premutación en FMR1. Schwartz y col²⁴ analizaron el número de repeticiones CGG en el gen FMR1 en 240 mujeres y hallaron que el 24% de las premutadas tenían FOP, contra el 14 % de las que portaban la mutación completa y el 8% de las controles. A partir de estos trabajos hay extensa bibliografía que asocia la premutación y la aparición de FOP²⁵⁻²⁷. Wittenbergger y col.²⁸ demostraron que entre el 10 y el 20% de las madres premutadas de niños con síndrome de x frágil desarrollan FOP. Por otra parte, la premutación se ha identificado entre el 0.8 y el 7.5% de mujeres con FOP esporádica y hasta en un 13% en mujeres con antecedentes familiares de la patología²⁸⁻³². La prevalencia de la premutación en controles ha sido estimada entre 1/100 y 1/300³³⁻³⁵. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo en nuestra población indicarían una frecuencia similar³⁶. Si bien el mecanismo molecular de la patogenia no está dilucidado, el estatus de premutación per se parecería influir en la expresión de la enfermedad.

Por otra parte, el gen FMR2 (locus FRAXE), que también está asociado a retardo mental, se encuentra a 600kb del FMR1 y tiene repeticiones del trinucleótido GCC en el exón 1 y su número es polimórfico en la población normal^{37,38}. Tal como para FMR1, se categorizó a los alelos según el número de repeticiones como normales (10 a 40), intermedios (41 a 60), premutados (61 a 200) o con mutación completa (más de 200). Las premutaciones también son inestables y las mutaciones completas, al igual que con FMR1, sufren metilación con la consecuente inactivación de la transcripción. A diferencia de lo que sucede con FMR1, la transmisión de una mutación completa puede ocurrir tanto por vía materna como por vía paterna y comúnmente se producen reducciones en el número de repeticiones, particularmente durante la transmisión paterna³⁹. El fenotipo asociado a la mutación completa de FMR2 no está muy bien definido hasta el momento. Los individuos afectados presentan retardo mental leve a moderado asociado a dificultades en el aprendizaje y usualmente a retraso en el lenguaje, déficit de atención, hiperactividad y comportamiento autista^{40,41}. La patología asociada se presenta por el silenciamiento del gen que se produce tanto por amplificación de los tripletes CCG como por una delección dentro del gen⁴².

Murray y colaboradores^{43,44} realizaron un tamizaje en una cohorte de 209 mujeres con FOP evaluando los sitios FRAXA y FRAXE en búsqueda de premutaciones y encontraron un exceso de alelos FRAXE con menos de 11 repeticiones. El análisis por secuenciación reveló que en 3 individuos esos alelos presentaban delecciones crípticas en FMR2, en la región cercana a las repeticiones GCC. Por lo tanto, propusieron que las delecciones en FMR2 podrían ser una causa significativa de FOP ya que se encontraron en el 1,5% de las mujeres afectadas por esta causa pero sólo en el 0,04% de las mujeres de la población general analizada. Estas delecciones se ubicaban en el sitio de iniciación de la transcripción o cercanas al mismo. Estos autores sugirieron que era posible que las delecciones en estas áreas tuvieran efectos dramáticos en la transcripción, ya sea impidiéndola o forzando la utilización de un sitio de iniciación alternativo, generando transcritos de FMR2 aberrantes. De hecho, existe evidencia de la presencia de un sitio de inicio alternativo a 12kb de FMR2⁴⁵ que parece ser específico para tejidos fetales y se sugiere la posibilidad de que la isoforma resultante se exprese inapropiadamente si se perdiera el sitio convencional de iniciación. Por otro lado, si la transcripción estuviese anulada, se esperaría que el efecto fuese el mismo que la presencia de una mutación completa en el gen. Asimismo, probablemente existan factores modificadores que contribuyan a los efectos de los genes anteriormente mencionados en la función ovárica.

Por otro lado, en algunos casos, pacientes con retardo mental y expansiones en FRAXA presentaron también delecciones asociadas en FRAXE⁴⁶⁻⁴⁹. Reforzando estas observaciones, Murray y col, hallaron alelos con la premutación en FMR1 y delección en FMR2⁴⁴.

Hasta la fecha, estos son los únicos trabajos que estudian la relación causal entre las delecciones en el gen FMR2 y la FOP. Más aún, hay muy pocos trabajos en la literatura referidos a FMR2, incluso en relación con su rol en el desarrollo de retardo mental^{50,51}. Por otro lado, y probablemente debido a que la posible asociación entre FMR2 y FOP no ha sido estudiada en otras poblaciones, no está claro si la presencia de la premutación en FMR1 junto con las delecciones en FMR2 pudiera estar asociada al desarrollo de la patología.

En los últimos años, un número cada vez más creciente de trabajos dan cuenta de la asociación entre el estado de premutación y FOP. Se ha demostrado que alrededor del 4% de las mujeres afectadas de FOP, son portadoras de la premutación en el gen FMR-1. Por lo tanto también es importante destacar, que este grupo de pacientes FOP posee un riesgo aumentado de

tener un niño afectado por SFX. Algunos autores han sugerido que dentro del rango de la premutación, existiría un número de tripletes acotado dentro de los cuales sería más propenso el desarrollo de la FOP. Recientemente, se ha propuesto que expansiones intermedias de tripletes entre 35 y 58, podrían estar asociadas al desarrollo de la patología⁵²⁻⁵³, sin embargo Benett y colaboradores desestimaron esta asociación⁵⁴.

La FOP afecta al 1% de las mujeres en edad fértil. La detección de las integrantes susceptibles dentro de una familia posibilitaría un mejor asesoramiento acerca de las posibilidades y conductas reproductivas de aquellas mujeres en riesgo. Por otra parte, si bien se conocen numerosas causas asociadas al desarrollo de la patología, el conocimiento de los factores genéticos involucrados en su patogenia resulta escaso.

En resumen, de acuerdo con la bibliografía, por un lado, existiría una asociación entre la presencia de deleciones en el gen FMR2 y el desarrollo de FOP y además, una asociación entre dichas deleciones y la cantidad de repeticiones CGG en el exón 1 del gen FMR1. En base a estos antecedentes propusimos dos objetivos para este trabajo:

- 1) Analizar la presencia de deleciones en el gen FMR2 y correlacionarla con el desarrollo de FOP.
- 2) Correlacionar el número de repeticiones CGG en el exón 1 de FMR1 con la presencia de deleciones en el gen FMR2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra: Para realizar el trabajo se procesaron dos grupos de muestras provenientes de: 120 pacientes en las que ya se habían estudiado distintos genes candidatos relacionados con FOP y que habían firmado un consentimiento informado para tal fin y 18 nuevas muestras de pacientes del Centro Nacional de Genética Médica que consultaron por FOP mientras se estaba llevando a cabo este estudio. A este grupo se le propuso participar del mismo y firmaron el consentimiento correspondiente.

Criterios de inclusión: La inclusión de pacientes se realizó de acuerdo con los criterios previamente establecidos⁵²⁻⁵⁴: amenorrea primaria o secundaria de al menos seis meses antes de los 40 años, valores elevados de FSH (>40 mUI/ml) en dos determinaciones sucesivas e hipoestrogenismo (<15 pg/ml). En todas ellas se descartó, previamente a su inclusión en el estudio molecular, la presencia de anomalías cromosómicas.

Controles: Mujeres mayores de 40 años, sin antecedentes familiares de FOP y/o retardo mental, con fertilidad comprobada, que al momento de ingresar en el protocolo no hubieran presentado FOP ni padecieran enfermedades autoinmunes. El trabajo se realizó con un banco de muestras provenientes de 83 controles mayores de 40 años en las cuales se analizaron distintos genes candidatos relacionados a FOP. En todos los casos se contó con consentimiento informado.

MÉTODOS

Extracción de ADN:

Se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica por el método de extracción salina⁵⁵.

Estudio de la presencia de tripletes expandidos del gen FMR1 y FMR2:

Para el análisis del tamaño de las repeticiones en ambos genes, la región genómica de interés se amplificó realizando una PCR fluorescente, utilizando iniciadores específicos para cada caso y una enzima taq polimerasa de alto rendimiento (Platimun Pfx) en ambos. Uno de los iniciadores (para cada gen) estaba marcado con un nucleótido fluorescente (FAM). Los diferentes fragmentos obtenidos se separaron por electroforesis capilar mediante el uso de un secuenciador automático y se analizaron mediante el software GeneScan.

Las muestras refractarias a la amplificación para FMR1, o que fueran homocigotas para un determinado número de tripletes, se re-analizaron por Southern blot mediante digestión con EcoRI y EagI (enzima de restricción sensible a metilación) e hibridación con sondas específicas marcadas con digoxigenina, a los efectos de descartar la presencia de alelos de alto peso molecular.

Estudio de la presencia de deleciones en el gen FMR2:

Para analizar la presencia de deleciones en el gen FMR2, se seleccionaron las muestras con “alelos mínimos” (cantidad de repeticiones menor a 11) detectadas con el estudio de la repeticiones de tripletes del gen. La región adyacente a las repeticiones se analizó con cebadores específicos por la técnica de secuenciación automática por el método de Sanger con terminadores fluorescentes.

Validación de la metodología

Para validar la metodología, se secuenciaron dos muestras de hombres control para determinar exactamente la cantidad de repeticiones que poseían. Asimismo, se enviaron dos muestras (una femenina y otra masculina) a un laboratorio en Seattle, USA, para corroborar los resultados. Luego de corroborar los resultados obtenidos, estas muestras fueron incluidas en todos los ensayos como controles internos.

Análisis estadísticos: Las diferencias de frecuencias genotípicas entre pacientes con FOP y las mujeres controles se estimaron por el test de Chi².

RESULTADOS

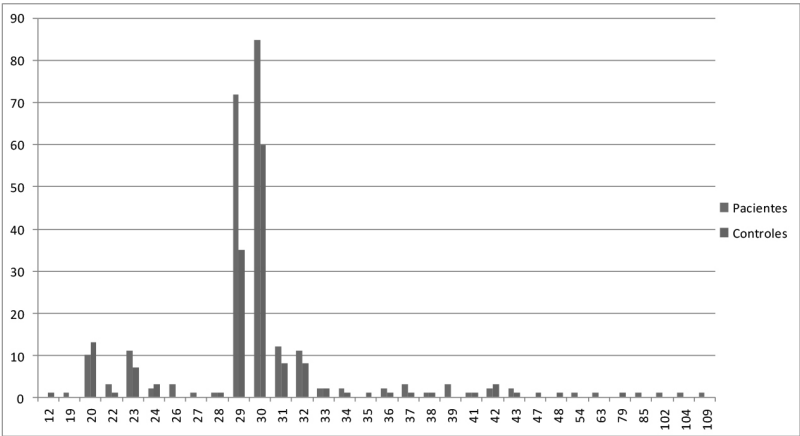
Del total de pacientes que formaron parte de la muestra se obtuvieron resultados para el estudio de los genes FMR1 y FMR2 en 120 afectadas con FOP (100 de tipo esporádico y 20 con antecedentes familiares) y en 76 controles.

Estudio del gen FMR1:

En la figura 1 se presenta la distribución de los alelos para el gen FMR1 en mujeres afectadas y controles. El número modal de repeticiones en el grupo de pacientes y controles fue 30 con rangos de repeticiones comprendidos entre 19- 109 para el primer grupo y entre 12-79 para el segundo. Cinco pacientes presentaron alelos premutados. Dentro del grupo control se observó sólo una mujer con una premutación. Se detectaron 11 pacientes y 10 mujeres del grupo control con un alelo con número de repeticiones en el rango intermedio. Las diferencias no resultaron significativas ($p=0,38$).

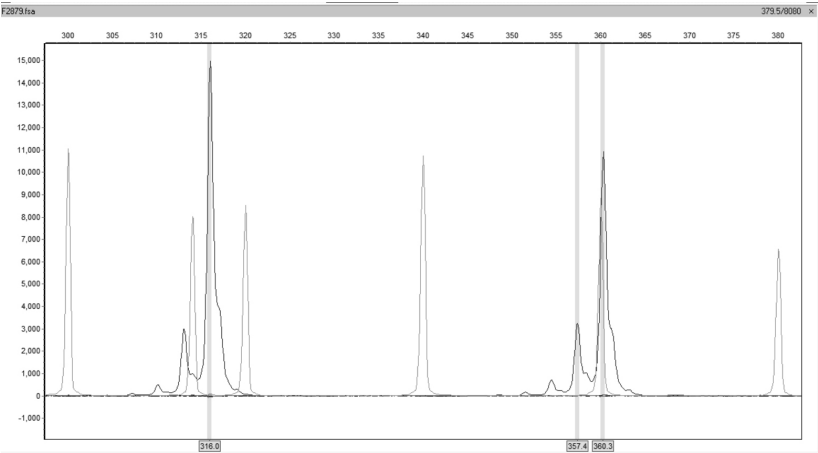
En la figura 2 se muestra a modo de ejemplo una electroforesis capilar del gen FMR1 en una mujer. Se observan dos picos correspondientes a los dos alelos del gen.

Figura 1. Distribución de los alelos del gen FMR1 en pacientes y controles



Referencias: En el eje de las **y** se muestra el número de alelos y en el de las **x** la cantidad de repeticiones que presenta cada alelo

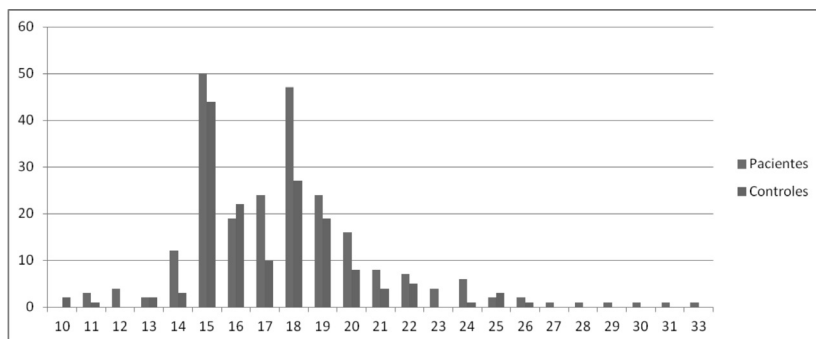
Figura 2: Electroforesis capilar del fragmento amplificado del gen FMR1



Estudio del gen FMR2:

En la figura 3 se presenta la distribución de los alelos para el gen FMR2 en mujeres afectadas y controles. La cantidad de repeticiones más frecuente observada en el gen FMR2 en el grupo de pacientes fue de 15 (rango 10-33). Entre las mismas, una paciente presentó 10 repeticiones y otras tres 11 (dos de ellas hermanas). En el grupo control, la cantidad de repeticiones más frecuente también fue de 15 (rango 9- 26). Dos mujeres presentaron un alelo con 9 repeticiones y otra un alelo con 11.

Figura 3. Distribución de los alelos del gen FMR2 en pacientes y controles



Referencias: En el eje de las y se muestra el número de alelos y en el de las x la cantidad de repeticiones que presenta cada alelo

En la figura 4 se muestra a modo de ejemplo una electroforesis capilar del gen FMR2 en una mujer. Se observan dos picos correspondientes a los dos alelos del gen.

Posteriormente, los alelos de menor tamaño, 10 y 11 repeticiones en las afectadas y 9 y 11 en las controles se secuenciaron y en ninguno se detectó la presencia de una delección en la zona analizada. Se compararon los resultados obtenidos para los alelos mínimos en el grupo de afectadas y controles y las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,68$).

En la figura 5 se muestra a modo de ejemplo la secuenciación del fragmento FMR2 obtenido en una de las pacientes.

Figura 4: Electroforesis capilar del fragmento amplificado del gen FMR2

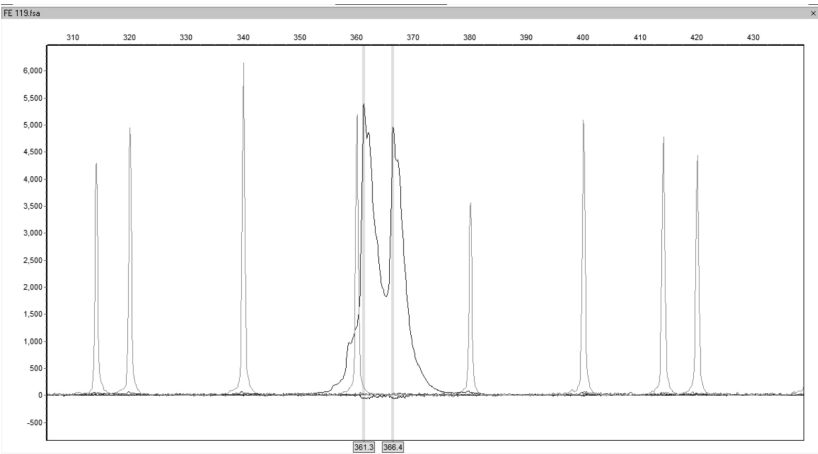
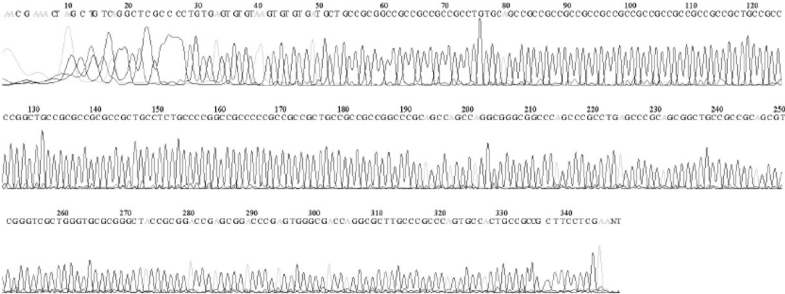


Figura 5: Secuenciación de un fragmento del gen FMR2.



DISCUSIÓN

La presencia de varias mujeres afectadas con FOP en una misma familia ha sugerido que esta patología podría tener un origen genético. Algunos trabajos publicados demostraron la presencia de mutaciones en genes relacionados con la función ovárica pero, en algunas poblaciones incluida la nuestra, los resultados no fueron concluyentes. Por otra parte, la detección

de distintas mutaciones en pacientes con FOP aislada en numerosos genes analizados indicaría que probablemente, esta enfermedad también es muy heterogénea en lo que a variantes genéticas se refiere.

En este trabajo se han analizado los genes FMR1 y FMR2 en una muestra de mujeres afectadas con FOP. En el caso del gen FMR1 a partir del año 1991 en que Cronister y colaboradores sugirieron que la frecuencia de FOP era mayor entre mujeres premutadas se realizaron numerosos trabajos que demostraron la asociación entre los dos sucesos. En nuestro estudio, entre las pacientes analizadas observamos que 5 presentaron una premutación en uno de sus alelos. Dos de ellas tenían antecedentes familiares de FOP. De acuerdo con estos resultados, obtuvimos una frecuencia estimada de 10% entre los casos familiares y de 3% en los casos esporádicos. Estos valores son similares a los obtenidas en otras poblaciones, ya que se reportó que entre el 0.8% y el 7.5% de mujeres con FOP esporádica y hasta un 13% de mujeres con antecedentes familiares de FOP son portadoras de un alelo con la premutación¹²⁻¹⁶. En las mujeres controles observamos sólo una con premutación, lo que arrojó una frecuencia de 1,3% dentro de este grupo.

Recientemente, se ha propuesto que las expansiones intermedias de tripletes entre 35 y 58 podrían estar asociadas al desarrollo de la patología^{17,18}. Sin embargo Benett y colaboradores desestimaron esta asociación¹⁹. En nuestra muestra observamos que 11 pacientes y 10 mujeres del grupo control presentaron un alelo en este rango. Las diferencias no resultaron significativas ($p=0,38$). Esto concuerda con lo observado por Benett y col.¹⁹

Todas las pacientes y controles que presentaron alelos mínimos para el gen FMR2, presentaron una cantidad normal de repeticiones para FMR1. Asimismo, al menos para la muestra analizada, no detectamos la presencia de deleciones en el gen FMR2 como causa de FOP por lo que tampoco se pudo establecer la asociación entre las mismas y la cantidad de repeticiones en FMR1, tal como había sido reportado por Murray y colaboradores.^{10,11}

REFERENCIAS

1. Santoro N. *Ann Endocrinol* 64:87-92.
2. Coulam C.B., Adamson S.C., Annegers J.F. *Obstet Gynecol* 67:604-606, 1986.
3. Hoek A., Schoemaker J., Drexhage H.A. *Endocr Rev* 18:107-134, 1997.
4. Coulam C.B., Stringfellow S., Hoefnagel D. *Fertil Steril* 40:693-695, 1983.
5. Mattison D.R., Evans M.I., Schwimmer W.B. y col. *Am J Hum Genet* 36:1341-1348, 1984.

6. Aittomaki K., Lucena J.L., Pakarinen P. y col. *Cell* 82:959-968, 1995.
7. Allen L.A., Achermann J.C., Pakarinen P. y col. *Hum Reprod* 18:251-256, 2003.
8. Simoni M., Nieschlag E., Gromoll J. *Human Reproduction Update* 8: 413-421, 2002.
9. Marozzi A., Porta C., Vegetti W. y col. *E: Hum Reprod* 17:1741-1745, 2002.
10. Whitney EA., Layman LC., Chan PJ. y col. *Fertil. Steril.* 64: 518-524, 1995.
11. Liu JY., Gromoll J., Cedars ML. y col. *Fertil. Steril.* 70: 326-331, 1998.
12. Conway G.S., Conway E., Walker C. y col. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 51:97-99, 1999
13. de la Chesnaye E., Canto P., Ulloa-Aguirre A. y col. *Am. J. Med. Genet.* 98; 125-128, 2001
14. Takakura K., Takebayashi K., Wang H.Q. y col. *Fertil.Steril.* 75:207-209, 2001
15. Tong Y., Liao WX., Roy AC. y col. *Horm.Metab Res.* 33: 221-226, 2001
16. Sundblad V., Chiauzzi V.A., Escobar M.E. y col. *Mol Cell Endocrinol* 222:53-59, 2004.
17. Sundblad V., Chiauzzi V.A., Landreone L. y col. *Hum Reprod* 21: 1154-6 2006.
18. Sundblad V., Chiauzzi VA., Andreone L. y col. *Research Trends in Endocrinology*, 4:21-27, 2010.
19. Kovanci E., Rohozinski J., Simpson J.L. y col. *Fertil Steril.* 87:143-6, 2007.
20. Watkins W.J., Umbers A.J., Woad K.J. y col. *Fertil Steril.* 86:1518-21, 2006
21. Laissue P., Christin-Maitre S., Touraine P. Y col. *Eur J Endocrinol*.154: 739-44 2006.
22. Jacquemont S, Birnbaum S, Redler S y col. *Eur J Hum Genet.* 2011;19
23. Cronister A, Schreiner R, Wittenberger M, Amiri K, Harris K, Hagerman RJ. *Med Genet* 1991; 38:269-74.
24. Schwartz CE, Dean J, Howard-Peebles PN, et al. *Am J Med Genet* 1994; 51:400-2.
25. Oostra B., Willemsem R. *Hum Mol Genet* 12: 249-57, 2003.
26. Allen E., He W., Yadav-Shah M. Y col. *Hum Genet* 114: 439-47, 2004
27. Goswami D., Conway G. *Hum Reprod* 11: 391-410, 2005.
28. Wittenbergger M.D., Hagerman R.J., Sherman S.L., y col. *Fertil Steril* 87: 456-65, 2007.
29. Conway G.S., Payne N.N., Webb J. y col. *Hum Reprod* 13: 1184-7, 1998.
30. Murray A., Webb J., Grimley S. y col. *J Med Genet* 35: 637-40, 1998.
31. Gersak K., Meden-Vrtovec H., Peterlin B. *Hum Reprod* 18:1637-40, 2003.
32. Bussani C., Papi L., Sestini R. Y col. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 112:189-91, 2004.
33. Hagerman R.J., Hagerman P. *Curr Opin Genet Dev* 12: 278-83, 2002.
34. Musci T.J., Caughey A.B. *Am J Obstet Gynecol* 192:1905-12, 2005.
35. Cronister A., DiMaio M., Mahoney M.J. y col. *Genet Med* 7:246-50, 2005.
36. Chiauzzi V.A., Ferder I., Alba L. y col. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo (RAEM)*, 47(4): 3-10, 2010.
37. Knight SJL, Flannery AV, Hirst MC y col. *Cell* 1993; 74:127-34.
38. Zhong N, Ju W, Curley D y col. *Am J Med Genet* 1996;64:415-19.
39. Hamel BCJ, Smits APT, Degraaf E y col. *Am J Hum Genet* 1994; 55:923-3.
40. Mulley JC, Yu S, Loesch DZ y col. *J Med Genet* 1995; 32:162-9.

41. Barnicoat AJ, Wang Q, Turk J y col. J Med Genet 1997; 34:13-18.
42. Stettner, G. M., Shoukier, M., Hoyer y col. Am. J. Med. Genet. 155A: 2003-2007, 2011.
43. Murray A, Webb J, Grimley S y col. J Med Genet 1998; 35:637-40
44. Murray A, Webb J, Dennis N y col. J Med Genet 1999; 36:767-770.
45. Gecz J, Bielby S, Sutherland GR y col. Genomics 1997;44:201-14.
46. Macpherson J, Murray A, Jacobs PA. 7th International Workshop on Fragile X and X-linked Mental Retardation 1995: abstract 65.
47. Zhong N, Yang W, Houck GE y col. 7th International Workshop on Fragile X and X-linked Mental Retardation 1995: abstract 62.
48. Holden JJA, JulienInalsingh C, Chalifoux M y col. Am J Med Genet 1996;64:420-4.
49. Brown TC, Tarleton JC, Go RCP y col. AM J Med Genet 1997;73:447-55.
50. Chakrabarti,L., Knight, A.; Flannery,K y KayDavies,K. Hum Mol Gen, 1996, Vol. 5, No. 2 275–282
51. Bensaid, M; Melko,M.; Bechara, E y col. Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 4 1269–1279
52. Bodega B, Bione S, Dalpra L. y col. Hum Reprod 2006;21: 952-952.
53. Bretherick KL, Fluker MR, Robinson WP. Human Genet 2005; 117:376-382.
54. Bennett CE, Conway GS, Macpherson JN y col. Hum Reprod. 2010 May;25(5):1335-8
55. S.A.Miller, D.D.Dykes y H.F.Polesky. NAR, 1988;16 (3).

GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE ORIGEN CLÍNICO Y AMBIENTAL DEL COMPLEJO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* DEL NORDESTE ARGENTINO

Cattana Maria Emilia; Sosa María de los Ángeles; Giusiano Gustavo Emilio
Instituto de Medicina Regional – Universidad Nacional del Nordeste

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Cryptococcus* más frecuentemente implicadas en enfermedades del hombre y otros animales son las del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* (*C. neoformans/C. gattii*), reservando el término criptococosis para las infecciones ocasionadas por estos agentes⁽¹⁻⁸⁾.

Hasta la aparición del VIH la criptococosis no era una micosis habitual, pero la pandemia de sida elevó dramáticamente la casuística convirtiéndola en una de las micosis emergentes más graves⁽⁹⁻¹¹⁾. La criptococosis meníngea en el paciente con VIH es una de las principales complicaciones infecciosas y se asocia con una significativa morbilidad^(9,12).

El nicho ecológico más importante de *C. neoformans* son las heces de paloma (*Columba livia*) y los suelos contaminados con excretas de éstas y otras aves^(3,13).

Ellis y Pfeifer relacionaron el hábitat natural de *C. gattii* con el árbol *Eucalyptus camaldulensis* y considerando que su distribución estaba confinada a algunas zonas de clima tropical y subtropical. Desde entonces se han reconocido nuevos hábitat y en distintos lugares del mundo⁽¹⁴⁻²⁰⁾.

Estudios de biología molecular demostraron que el complejo *C. neoformans/C. gattii* comprende 8 tipos moleculares principales: tipos VNI=AFLP1 y VNII=AFLP1A (*C. neoformans* var. *grubii*), tipo VNIII=AFLP3 (*C. neoformans* híbrido), tipo VNIV=AFLP2 (*C. neoformans* var. *neoformans*), tipos VGI=AFLP4, VGII=AFLP6, VGIII=AFLP5 y VGIV=AFLP7 para *C. gattii* (21-32) *an encapsulated yeast pathogen, were separated by contour-clamped homogeneous field gel electrophoresis. Seven strains representing all four serotypes were studied. It was found that each strain had a unique, reproducible pattern of chromosome bands which could potentially be used for strain polymorphism studies. There were between 10 and 12 chromosomes in the strains studied, with an approximate genomic size of 15,000 to 17,000 kilobases. Chromosome separation also could be used to assign locations for*

cloned genes, and the ribosomal DNA genes were found on one of the larger *C. neoformans* chromosomes. The technique of electrophoretic karyotyping should be helpful for genetic and molecular investigations into the biology of *C. neoformans*.”, “author”: [{ “dropping-particle”: “”, “family”: “Perfect”, “given”: “J R”, “non-dropping-particle”: “”, “parse-names”: false, “suffix”: “” }, { “dropping-particle”: “”, “family”: “Magee”, “given”: “B B”, “non-dropping-particle”: “”, “parse-names”: false, “suffix”: “” }, { “dropping-particle”: “”, “family”: “Magee”, “given”: “P T”, “non-dropping-particle”: “”, “parse-names”: false, “suffix”: “” }], “container-title”: “Infection and immunity”, “id”: “ITEM-1”, “issue”: “9”, “issued”: { “date-parts”: [[“1989”, “9”]] }, “page”: “2624-7”, “title”: “Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis.”, “type”: “article-journal”, “volume”: “57” }, “uris”: [“http://www.mendeley.com/documents/?uuid=2c303865-a6c0-4469-9c5e-4787a8764895”] }, { “id”: “ITEM-2”, “itemData”: { “ISSN”: “0022-1287”, “PMID”: “2674325”, “abstract”: “The electrokaryotype of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* is described for the first time. Three different patterns were seen: (a.

Los estudios de epidemiología molecular sugieren que existen asociaciones entre el origen geográfico y determinados genotipos, así como también en la sensibilidad a los antifúngicos y la posibilidad de brotes (33–39) with LHF that ranged between 4 microg/ml and 32 microg/ml. A considerably higher proportion of the *C. gattii* strains (86%). En la región noreste de nuestro país no se han realizado hasta el momento estudios epidemiológicos moleculares sobre la distribución del complejo en el ambiente, ni tampoco los tipos moleculares que se presentan como agente etiológico de criptococosis.

El objetivo fue determinar los genotipos del complejo *C. neoformans/C. gattii* prevalentes en el ambiente y como agente de criptococosis, en las ciudades de Resistencia y Corrientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron cepas con identificación presuntiva de complejo *C. neoformans/C. gattii* aisladas de muestras clínicas humanas en distintos nosocomios públicos y privados de las ciudades de Resistencia y Corrientes, que fueron derivadas como tal al Área de Micología del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), durante los años 2009 al 2014; y cepas aisladas de excretas de palomas y árboles de plazas y parques de las mismas ciudades en el mismo periodo de tiempo.

Extracción del ADN: se utilizaron repiques de 24-48 hs en medio SDA de las cepas puras y se realizó la extracción según lo descrito por Bosco Borgeat y col.⁽⁴⁰⁾.

PCR-RFLP del gen *URA5*: la reacción se llevó a cabo según lo descrito por Meyer y col.⁽²⁶⁾, con los iniciadores *URA5* (5'ATGTCCTCCCAAGCCCTC-GACTCCG3') y *SJ01* (5'TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC3') (IDT). Luego se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *Hin6I* y *Sau96I*. Los patrones generados fueron comparados con los obtenidos para las cepas de referencia sugeridas por Meyer y col.⁽³²⁾.

RESULTADOS

Se realizó la tipificación molecular de 132 aislamientos del complejo *C. neoformans/C. gattii*, 43 de los cuales pertenecen a aislamientos ambientales y 89 a aislamientos clínicos.

En la **tabla 1** se describen los lugares de recolección, fuente de aislamiento y los genotipos hallados en cada aislamiento ambiental.

Tabla 1. Fuente y ciudad de aislamiento e identificación molecular de las 43 cepas ambientales estudiadas

IMR-ML	Fuente de aislamiento	Genotipo	Ciudad de Aislamiento	IMR-ML	Fuente de aislamiento	Genotipo	Ciudad de Aislamiento
418	Excretas de paloma	VNI	Corrientes	848	<i>Peltophorum dubium</i> (Ibirápitá) ¹	VNI	Resistencia
419	Excretas de paloma	VNI	Resistencia	852	<i>Grevillea robusta</i> (Roblesedoso)	VGI	Resistencia
420	Excretas de paloma	VNI	Resistencia	941	<i>Grevillea robusta</i> (Roblesedoso)	VGI	Resistencia
421	Excretas de paloma	VNI	Corrientes	969	Tipuana tipu (Tipa)	VNI	Corrientes
422	Excretas de paloma	VNI	Corrientes	1014	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
423	Excretas de paloma	VNI	Corrientes	1016	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
427	Excretas de paloma	VNI	Resistencia	1017	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
688	Tabebuia avellanae (Lapacho)	VNI	Resistencia	1033	Excretas de paloma	VNI	Resistencia
689	Tipuana tipu (Tipa)	VNI	Resistencia	1034	Excretas de paloma	VNI	Resistencia
690	Thuja sp. (Tuya)	VNI	Resistencia	1210	Excretas de paloma	VNI	Corrientes

IMR-ML	Fuente de aislamiento	Genotipo	Ciudad de Aislamiento	IMR-ML	Fuente de aislamiento	Genotipo	Ciudad de Aislamiento
823	<i>Peltophorum dubium</i> (Ibirápitá) ²	VNI	Resistencia	1211	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
824	<i>Peltophorum dubium</i> (Ibirápitá) ²	VNI	Resistencia	1212	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
825	<i>Peltophorum dubium</i> (Ibirápitá) ²	VNI	Resistencia	1213	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
826	<i>Peltophorum dubium</i> (Ibirápitá) ²	VNI	Resistencia	1214	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
827	<i>Peltophorum dubium</i> (Ibirápitá) ²	VNI	Resistencia	1215	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
828	<i>Peltophorum dubium</i> (Ibirápitá) ²	VNI	Resistencia	1216	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
829	<i>Peltophorum dubium</i> (Ibirápitá)	VNI	Resistencia	1217	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
844	<i>Peltophorum dubium</i> (Ibirápitá) ¹	VNI	Resistencia	1218	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
845	<i>Peltophorum dubium</i> (Ibirápitá) ¹	VNI	Resistencia	1219	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
846	<i>Peltophorum dubium</i> (Ibirápitá) ¹	VNI	Resistencia	1220	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
847	<i>Peltophorum dubium</i> (Ibirápitá) ¹	VNI	Resistencia	1221	Excretas de paloma	VNI	Corrientes
1231	Excretas de paloma	VNIII	Corrientes				

¹ Aislamientos obtenidos del mismo árbol;
² Aislamientos obtenidos del mismo árbol

En la **tabla 2** se muestran los genotipos hallados por medio de la identificación genotípica de cada aislamiento clínico estudiado; así como también la ciudad de aislamiento.

Tabla 2. Ciudad de aislamiento e identificación genotípica de los 89 aislamientos clínicos estudiados

IMR-ML	Genotipo	Ciudad de aislamiento	IMR-ML	Genotipo	Ciudad de aislamiento
468	VNI	Corrientes	982	VNI	Corrientes
585	VNI	Corrientes	983	VNI	Corrientes
705	VNI	Corrientes	984	VNI	Corrientes
707	VNI	Corrientes	985	VNI	Corrientes
640	VNI	Resistencia	986	VNI	Corrientes

IMR-ML	Genotipo	Ciudad de aislamiento	IMR-ML	Genotipo	Ciudad de aislamiento
641	VNI	Resistencia	977	VNI	Corrientes
652	VNI	Corrientes	978	VNI	Corrientes
704	VNI	Corrientes	979	VNI	Corrientes
706	VNI	Corrientes	980	VNI	Corrientes
708	VNI	Corrientes	1011	VGI	Resistencia
709	VNI	Corrientes	1012	VGI	Resistencia
673	VNII	Resistencia	1083	VNIII(VNII-VNIV)	Corrientes
692	VNI	Resistencia	1084	VNI	Corrientes
693	VNI	Resistencia	1085	VNI	Corrientes
694	VNII	Resistencia	1086	VNI	Corrientes
695	VNI	Resistencia	1107	VNI	Resistencia
696	VNI	Resistencia	1108	VNIII(VNII-VNIV)	Corrientes
781	VNI	Resistencia	1115	VNII	Corrientes
782	VNI	Resistencia	1125	VNI*	Corrientes
783	VNI	Resistencia	1128	VNI	Corrientes
784	VNI	Resistencia	1196	VNI	Corrientes
801	VNI	Resistencia	1129	VNI	Resistencia
806	VNII	Corrientes	1135	VNI	Corrientes
807	VNI	Corrientes	1136	VNI	Corrientes
808	VNI	Resistencia	1137	VNI	Resistencia
809	VNI	Resistencia	1143	VNI	Corrientes
814	VNI	Corrientes	1150	VNI	Corrientes
839	VNI	Resistencia	1151	VNI	Corrientes
841	VNI	Resistencia	1154	VNI	Resistencia
849	VNI	Corrientes	1155	VNI	Resistencia
853	VNI	Resistencia	1156	VNI	Resistencia
865	VNI	Resistencia	1168	VNI	Resistencia
866	VNI	Resistencia	1170	VNI	Resistencia
981	VNI	Corrientes	1171	VNI	Resistencia
987	VNI	Corrientes	1172	VNI	Corrientes
872	VNI	Resistencia	1188	VNI	Resistencia
873	VNI	Resistencia	1184	VNI	Corrientes
875	VNI	Resistencia	1193	VNI	Corrientes
879	VNI	Resistencia	1194	VNII	Resistencia
889	VNI	Resistencia	1195	VNII	Resistencia
897	VNI	Resistencia	1196	VNI	Corrientes
898	VNI	Resistencia	1198	VNI	Corrientes
899	VNI	Resistencia	1199	VNI	Corrientes
902	VNI	Resistencia	1234	VGI	Corrientes
915	VNII	Resistencia			

IMR-ML: Siglas de identificación de la Colección de Cultivos de levaduras del área Micología del Instituto de Medicina Regional de la UNNE.

DISCUSIÓN

La criptococosis no era una micosis habitual, pero la aparición del VIH provocó un aumento drástico en la casuística de esta micosis, convirtiéndola en una de las infecciones marcadoras de sida (3,12,41,42).

En este estudio, tanto entre los aislamientos ambientales como en los clínicos, se observó una significativa prevalencia del genotipo VNI (*C. neoformans* var. *grubii*), constituyendo el 89% del total de aislados, 93% entre los de origen ambiental, y 87% entre los de origen clínico. Esto concuerda con los informes que indican a *C. neoformans* genotipo VNI como el causante de la mayoría de las criptococosis y que es el genotipo más prevalente en el ambiente en todo el mundo (26,43–47)340 clinical, veterinary, and environmental isolates from Argentina, Brazil, Chile, Colombia, Mexico, Peru, Venezuela, Guatemala, and Spain were typed by using M13 polymerase chain reaction-fingerprinting and orotidine monophosphate pyrophosphorylase (URA5).

De los 18 aislados obtenidos de árboles, se encontró que en 16 (89%) el genotipo era VNI y en 2 (11%) el genotipo fue VGI.

Si bien el hábitat natural principal de *C. neoformans* son nidos de palomas y otros lugares con acumulación de excretas de aves (3,48,49)we have isolated *C. neoformans* var. *gattii* on 35 separate occasions, all from samples associated with *E. camaldulensis*. The global distribution of *E. camaldulensis* appears to correspond to the epidemiologic distribution of cryptococcosis caused by *C. neoformans* var. *gattii*. No other environmental source for the fungus has yet been detected, and no other eucalypt has the distribution pattern corresponding to reported cases caused by this fungus. These findings may provided an explanation for the high incidence of infections caused by *C. neoformans* var. *gattii* in Australian aborigines living in the Northern Territory and for its low worldwide incidence in acquired immunodeficiency syndrome patients.”, “author” : [{ “dropping-particle” : “”, “family” : “Ellis”, “given” : “D H”, “non-dropping-particle” : “”, “parse-names” : false, “suffix” : “” }, { “dropping-particle” : “”, “family” : “Pfeiffer”, “given” : “T J”, “non-dropping-particle” : “”, “parse-names” : false, “suffix” : “” }], “container-title” : “Journal of clinical microbiology”, “id” : “ITEM-1”, “issue” : “7”, “issued” : { “date-parts” : [[“1990”, “7”]] }, “page” : “1642-4”, “title” : “Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.”, “type” : “article-journal”, “volume” : “28” }, “uris” : [“http://www.mendeley.com/documents/?uuid=3ae59c31-6b33-4a82-bd91-1a807e3740c7”] }, { “id” : “ITEM-2”, “itemData” : { “ISSN” : “0140-6736”, “PMID” : “1976940”,

“abstract” : “*Cryptococcus neoformans* is a biotrophic smut-like fungus, and the epidemiology of cryptococcosis can mainly be explained by exposure to an infective aerosolised inoculum. For *C. neoformans* var *gattii* it is postulated that the principal infectious propagule is the basidiospore and that exposure to *Eucalyptus camaldulensis*, the host tree, is required to initiate infection in man and animals. *C. neoformans* var *gattii* may have been exported from Australia by infected seeds of *E. camaldulensis* containing dormant dikaryotic mycelium of the fungus. For *C. neoformans* var *neoformans* both the basidiospore and desiccated encapsulated yeast cells are postulated to act as infectious propagules, the basidiospores showing a seasonal distribution in association with an as yet unidentified host plant, and the encapsulated yeast cells dispersed from accumulations of dried bird (mainly pigeon, la presencia de esta especie se ha confirmado en los agujeros y troncos de árboles (13). En este estudio, *C. neoformans* fue encontrado en *Tabebuia avellanadae* y *Peltophorum dubium*, ambas especies arbóreas nativas de Argentina. No se encuentran referencias acerca de estas especies de árboles como nicho para cualquier especie del género *Cryptococcus*.

Aunque tradicionalmente *C. gattii* se asoció a árboles de *Eucalyptus*, su aislamiento de este árbol fuera de Australia es considerada poco frecuente (14,48,50). Nuestros resultados son consistentes con esto último, ya que de ninguno de los árboles de eucalipto muestreados se aisló esta especie de *Cryptococcus*, sin embargo *C. gattii* se aisló en la ciudad de Resistencia de dos viejos ejemplares de *Grevillea robusta*, constituyendo el primer informe que se refiere a esta especie como huésped para este hongo (18,20). De acuerdo con otros autores, este resultado muestra que el nicho ecológico de *C. gattii* no se limita a las especies de árboles específicos (14,15,19,51–53).

Las cepas de *C. gattii* aisladas de árboles eran tipo VGI. Esto coincide con lo informado por Refojo et al. y Davel et al., que aislaron este genotipo en la ciudad de Buenos Aires (19,54). En otros países sudamericanos, como Brasil y Colombia, los genotipos más comunes son VGII y VGIII (47,55–57) 91.1% were of serotype A, 8.4% serotype B and 0.5% serotype C. Of the 247 environmental isolates, 44.2% were of serotype A, 42.6% serotype B and 13.2% serotype C. No serotype D isolates were isolated. Serotype AD has not been recovered in Colombia. PCR fingerprinting with the primers M13, (GACA. Esto podría indicar una variación geográfica en la distribución de los tipos moleculares de *C. gattii*.

De los 3 (3%) aislamientos de *C. gattii* de origen clínico, 2 eran genotipo VGI y 1 VGII. Los genotipos VGI y VGII son los que refieren menor sensibili-

dad a los antifúngicos y mayores niveles de heteroresistencia, especialmente al fluconazol, droga utilizada normalmente como terapia de mantenimiento y terapia profiláctica para la criptococosis (33,34). Esto destaca la importancia de la tipificación molecular, ya que puede brindar una importante información para orientar al tratamiento y profilaxis. De nuestros datos y el de otros autores de Argentina se observa que el genotipo VGI es el tipo molecular más prevalente entre los aislamientos clínicos y ambientales de *C. gattii* (46). Además, estos genotipos pueden convertirse en cepas hipervirulentas (39,58), y causar brotes como los ocurrido en la isla de Vancouver, Canadá (35,36) y su extensión al noroeste del Pacífico en los Estados Unidos (37,38,59) British Columbia, Canada, it now involves mainland British Columbia, and Washington and Oregon in the United States. In Canada, the incidence of disease has been one of the highest worldwide. In the United States, lack of cryptococcal species identification and case surveillance limit our knowledge of *C. gattii* epidemiology. Infections in the Pacific Northwest are caused by multiple genotypes, but the major strain is genetically novel and may have emerged recently in association with unique mating or environmental changes. *C. gattii* disease affects immunocompromised and immunocompetent persons, causing substantial illness and death. Successful management requires an aggressive medical and surgical approach and consideration of potentially variable antifungal drug susceptibilities. We summarize the study results of a group of investigators and review current knowledge with the goal of increasing awareness and highlighting areas where further knowledge is required.”,

“author”: [{ “dropping-particle”: “”, “family”: “Datta”, “given”: “Kausik”, “non-dropping-particle”: “”, “parse-names”: false, “suffix”: “” }, { “dropping-particle”: “”, “family”: “Bartlett”, “given”: “Karen H”, “non-dropping-particle”: “”, “parse-names”: false, “suffix”: “” }, { “dropping-particle”: “”, “family”: “Baer”, “given”: “Rebecca”, “non-dropping-particle”: “”, “parse-names”: false, “suffix”: “” }, { “dropping-particle”: “”, “family”: “Byrnes”, “given”: “Edmond”, “non-dropping-particle”: “”, “parse-names”: false, “suffix”: “” }, { “dropping-particle”: “”, “family”: “Galanis”, “given”: “Eleni”, “non-dropping-particle”: “”, “parse-names”: false, “suffix”: “” }, { “dropping-particle”: “”, “family”: “Heitman”, “given”: “Joseph”, “non-dropping-particle”: “”, “parse-names”: false, “suffix”: “” }, { “dropping-particle”: “”, “family”: “Hoang”, “given”: “Linda”, “non-dropping-particle”: “”, “parse-names”: false, “suffix”: “” }, { “dropping-particle”: “”, “family”: “Leslie”, “given”: “Mira J”, “non-dropping-particle”: “”, “parse-names”: false, “suffix”: “” }, { “dropping-particle”: “”, “family”: “MacDougall”, “given”: “Laura”, “non-dropping-particle”: “”, “parse-names”: false, “suffix”: “” }

: "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Magill", "given" : "Shelley S", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Morshed", "given" : "Muhammad G", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Marr", "given" : "Kieren a", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }], "container-title" : "Emerging infectious diseases", "id" : "ITEM-1", "issue" : "8", "issued" : { "date-parts" : [["2009", "8"]] }, "page" : "1185-91", "title" : "Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States.", "type" : "article-journal", "volume" : "15", "uris" : ["http://www.mendeley.com/documents/?uuid=e78a1875-8a33-4379-a9af-3dffb4d7eb43"]], { "id" : "ITEM-2", "itemData" : { "DOI" : "10.1155/2009/176532", "ISSN" : "1687-708X", "PMID" : "19266091", "abstract" : "The relatively uncommon fungal pathogen *Cryptococcus gattii* recently emerged as a significant cause of cryptococcal disease in human and animals in the Pacific Northwest of North America. Although genetic studies indicated its possible presence in the Pacific Northwest for more than 30 years, *C. gattii* as an etiological agent was largely unknown in this region prior to 1999. The recent emergence may have been encouraged by changing conditions of climate or land use and/or host susceptibility, and predictive ecological niche modeling indicates a potentially wider spread. *C. gattii* can survive wide climatic variations and colonize the environment in tropical, subtropical, temperate, and dry climates. Long-term climate changes, such as the significantly elevated global temperature in the last 100 years, influence patterns of disease among plants and animals and create niche microclimates habitable by emerging pathogens. *C. gattii* may have exploited such a hitherto unrecognized but clement environment in the Pacific Northwest to provide a wider exposure and risk of infection to human and animal populations.", "author" : [{ "dropping-particle" : "", "family" : "Datta", "given" : "Kausik", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Bartlett", "given" : "Karen H", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }, { "dropping-particle" : "", "family" : "Marr", "given" : "Kieren A", "non-dropping-particle" : "", "parse-names" : false, "suffix" : "" }], "container-title" : "Interdisciplinary perspectives on infectious diseases", "id" : "ITEM-2", "issue" : { "date-parts" : [["2009", "1"]] }, "page" : "1-8", "title" : "Cryptococcus gattii: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche.", "type" : "article-journal", "volume" : "2009", "uris" : ["http://www.mendeley.com/documents/?uuid=8daadacf-15cf-4618-a9b4-6ca7a1fc99e0"]], { "id" : "ITEM-3", "itemData" : { "DOI" : "10.1016/j.micinf.2011.05.009.Cryp-

tococcus", "author": [{ "dropping-particle": "", "family": "Byrnes", "given": "Edmond J.", "non-dropping-particle": "", "parse-names": false, "suffix": "" }, { "dropping-particle": "", "family": "Bartlett", "given": "Karen H.", "non-dropping-particle": "", "parse-names": false, "suffix": "" }, { "dropping-particle": "", "family": "Perfect", "given": "John R.", "non-dropping-particle": "", "parse-names": false, "suffix": "" }, { "dropping-particle": "", "family": "Heitman", "given": "Joseph", "non-dropping-particle": "", "parse-names": false, "suffix": "" }], "container-title": "Microbes and infection / Institut Pasteur", "id": "ITEM-3", "issue": "11", "issued": { "date-parts": [["2011"]] }, "page": "895-907", "title": "Cryptococcus gattii: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals", "type": "article-journal", "volume": "13", "uris": ["http://www.mendeley.com/documents/?uuid=2fe8c336-3e23-4120-993f-eac70e0f604e"]], "mendeley": { "formattedCitation": "(37,38,59. También se registraron brotes en áreas consideradas endémicas como son el norte de Brasil y Australia (43,56,57) imported from previous epidemiological studies as well as two culture collections, were analyzed for: place of isolation, source (clinical or environmental).

En excretas de palomas se han encontrado sólo aislados de *C. neoformans*, siendo en 24 de los 25 aislados (96%) genotipo VNI y uno (4%) VNIII (VNI-VNII-VNIV). No se han encontrado aislamientos de *C. gattii*. Esto coincide con la bibliografía, donde se ve una alta prevalencia del genotipo VNI en este tipo de muestras, siendo infrecuente encontrar otro genotipo (55,60,61).

Se encontraron 2 aislamientos clínicos *C. neoformans* híbrido VNIII (VNII-VNIV) de la provincia de Corrientes. Este híbrido también fue informado por el Estudio Multicéntrico de Criptococosis en Argentina, aunque comparativamente en una proporción menor (62,63). Diversas investigaciones realizadas a nivel mundial han puesto de manifiesto asociaciones entre el origen geográfico y determinados genotipos. Actualmente, se ha observado un cambio en la distribución geográfica de los genotipos VNIII y VNIV con un aumento de su prevalencia en Latinoamérica, genotipos que habitualmente eran informados principalmente en el sur de Europa (46).

CONCLUSIONES

En nuestro medio existe la circulación de tres de los cuatro genotipos de *C. neoformans*, y los genotipos más potencialmente virulentos de *C. gattii*.

La relevancia que ha tomado la criptococosis en nuestro medio, hace necesario conocer la epidemiología molecular de este complejo en nuestro medio, para poder entender su comportamiento. Estos resultados permiten conformar un mapa de los genotipos del complejo *C. neoformans/C. gattii* circulantes en el NEA a partir del cual se podrá monitorear la posible movilidad o cambios en la distribución.

REFERENCIAS

1. Kwon-Chung K. *Filobasidiella* Kwon-Chung (1975). In: Kurtzman CP, Fell J., Boekhout T, editors. The Yeasts A Taxonomic Study. Fifth Ed. London: Elsevier; 2011. p. 1443–55.
2. Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect.* 2003;5:667–75.
3. Kwon-Chung KJ. Cryptococcosis. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, editors. Medical Mycology. Philadelphia-London: Lea & Febiger; 1992. p. 397–446.
4. Kurtzman C, Fell J, Boekhout T. The Yeasts A taxonomic Study. Fifth Ed. Kurtzman C, Fell J, Boekhout T, editors. Elsevier; 2011.
5. Tintelnot K, Losert H. Isolation of *Cryptococcus adeliensis* from clinical samples and the environment in Germany. *J Clin Microbiol.* 2005;43(2):1007.
6. Liu Y, Ma S, Wang X, Xu W, Tang J. *Cryptococcus albidus* encephalitis in newly diagnosed HIV-patient and literature review. *Med Mycol Case Rep.* Elsevier; 2014;3:8–10.
7. Molina-Leyva A, Ruiz-Carrascosa JC, Leyva-Garcia A, Husein-Elahmed H. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. *Int J Infect Dis.* International Society for Infectious Diseases; 2013;17(12):e1232–3.
8. Cheng M, Chiou CC, Liu Y, Wang H, Hsieh K. *Cryptococcus laurentii* Fungemia in a Premature Neonate. *J Clin Microbiol.* 2001;39(4):1608–11.
9. Negroni R. Micosis en pacientes con SIDA. *Rev Argent Microbiol.* 1995;13:13–4.
10. Harrison TS. The burden of HIV-associated cryptococcal disease. *AIDS.* 2009;23(4):531–2.
11. Park BJ, Wannemuehler K a, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids.* 2009;23(4):525–30.
12. Bava AJ. Criptococosis en la República Argentina. Universidad de Buenos Aires; 1993.
13. Sorrell TC, Ellis DH. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol.* 1997;14(2):42–3.
14. Springer D, Chaturvedi V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(1):14–20.
15. Randhawa HS, Mussa a Y, 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(2):63–9.

16. Baró T, Torres-Rodríguez J, Hermoso de Mendoza M, Morera Y, Alía C. First Identification of Autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* Isolated from Goats with Predominantly Severe Pulmonary Disease in Spain. *J Clin Microbiol.* 1998;36(2):458–61.
17. Montagna MT, Santacroce MP, Caggiano G, Tatò D, Ajello L. Cavernicolous habitats harbouring *Cryptococcus neoformans*: results of a speleological survey in Apulia, Italy, 1999-2000. *Med Mycol.* 2003;41(5):451–5.
18. Mazza M, Refojo N, Bosco-Borgeat ME, Taverna CG, Trovero AC, Rogé A, et al. *Cryptococcus gattii* in urban trees from cities in North-eastern Argentina. *Mycoses.* 2013;56(6):646–50.
19. Refojo N, Perrotta D, Brudny M, Abrantes R, Hevia I, Davel G. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. *Med Mycol.* 2009;47(2):177–84.
20. Cattana ME, Sosa MA, Fernández MS, Rojas FD, Mangiaterra M, Giusiano GE. Native trees of the Northeast Argentina: Natural hosts of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(3):188–92.
21. Perfect JR, Magee BB, Magee PT. Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. *Infect Immun.* 1989;57(9):2624–7.
22. Polacheck I, Lebens G a. Electrophoretic karyotype of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *J Gen Microbiol.* 1989;135(1):65–71.
23. Meyer W, Marszewska K, Marszewska M, Igreja Pereira R, Hardtke C, Methling K, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis.* 1999;20:1790–9.
24. Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ, Vilgalys R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* 1993;31(9):2274–80.
25. Sorrell TC, Chen SCA, Ruma P, Meyer W, Pfeiffer TJ, Ellis DH, et al. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1996;34(5):1253–60.
26. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(2):189–95.
27. Latouche GN, Huynh M, Sorrell TC, Meyer W. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Phospholipase B (PLB1) Gene for Subtyping of *Cryptococcus neoformans* Isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(4):2080–6.
28. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* 2001;147(Pt 4):891–907.
29. Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics.* 2006;172(4):2223–38.
30. Day JN, Hoang TN, Duong A V, Hong CTT, Diep PT, Campbell JI, et al. Most cas-

- es of cryptococcal meningitis in HIV-uninfected patients in Vietnam are due to a distinct amplified fragment length polymorphism-defined cluster of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VN1. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):658–64.
31. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Diaz MR, Spanjaard L, Dromer F, et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(4):599–607.
 32. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol.* 2009;47(6):561–70.
 33. Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lázera M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* species complex. *Med Mycol.* 2012;50:328–32.
 34. Varma a, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(6):2303–11.
 35. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(49):17258–63.
 36. Stephen C, Lester S, Black W, Fyfe M, Raverty S. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. *Can Vet J.* 2002;43:792–4.
 37. Datta K, Bartlett KH, Baer R, Byrnes E, Galanis E, Heitman J, et al. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(8):1185–91.
 38. Datta K, Bartlett KH, Marr KA. *Cryptococcus gattii*: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009;2009:1–8.
 39. Byrnes EJ, Li W, Ren P, Lewit Y, Voelz K, Fraser JA, et al. A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in southern Californian HIV/AIDS patients. Mitchell AP, editor. *PLoS Pathog.* Public Library of Science; 2011;7(9):e1002205.
 40. Bosco Borgeat M, Mazza M, Refojo N, Taverna M. Tipificación molecular de especies del género *Cryptococcus*. In: Merino L, Giusiano G, editors. Manual de métodos moleculares para estudios microbiológicos. Primera. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 2011. p. 164–6.
 41. Dore GJ, Cooper DA. AIDS : Clinical Manifestations. *Encycl LIFE Sci.* 2001;1–8.
 42. Mónaco LS, Tamayo Antabak N. Criptococosis en pacientes con SIDA : estudio de casos en el Hospital Paroissien en el período 1996-2007. *Rev Argent Microbiol.* 2008;40:218–21.
 43. Meyer W, Trilles L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex. *Aust Biochem.* 2010;41(1):11–5.
 44. Cogliati M, Zamfirova RR, Tortorano AM, Viviani MA. Molecular epidemiology of Italian clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates. *Med Mycol.* 2013;1–8.
 45. Negroni R. Cryptococcosis. *Clin Dermatol.* 2012;30(6):599–609.
 46. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica (Cairo).* 2013;1–23.
 47. Escandón P, Sánchez A, Martínez M, Meyer W, Castañeda E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species

- complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(4):625–35.
48. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol.* 1990;28(7):1642–4.
49. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet (London, England)*. 1990;336(8720):923–5.
50. Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(5):1433–43.
51. Escandón P, Sánchez a, Firacative C, Castañeda E. Isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII, from *Corymbia ficifolia* detritus in Colombia. *Med Mycol.* 2010;48(4):675–8.
52. Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. 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(3):199–209.
53. Lazéra MS, Cavalcanti M a S, 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(2):119–22.
54. Davel G, Abrantes R, Brudny M, Córdoba S, Roderio L, Canteros CE, et al. Primer aislamiento ambiental de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2003;35(2):110–2.
55. Casali A, Goulart L, Rosaesilva L, Ribeiro M, Amaral A, Alves S, et al. Molecular typing of clinical and environmental isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res.* 2003;3(4):405–15.
56. Santos WR a Dos, Meyer W, Wanke B, Costa SPSE, Trilles L, Nascimento JLM Do, et al. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(8):813–8.
57. Trilles L, Lazéra MDS, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(5):455–62.
58. Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza C a, Griffiths EJ, et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group; 2011;9(3):193–203.
59. Byrnes EJ, Bartlett KH, Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes Infect.* 2011;13(11):895–907.
60. Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. *Mycopathologia.* 2006;161(2):83–91.
61. Romeo O, Scordino F, Chillemi V, Criseo G. *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex in southern Italy: an overview on the environmental diffusion of serotypes, genotypes and mating-types. *Mycopathologia.* 2012;174(4):283–91.
62. Bosco Borgeat M, Taverna C, Murisengo O, Mazza M, Canteros C, Davel G, et al. Estudio Multicéntrico de Criptococosis en Argentina-Estado de Avance del Primer

Año. XII Congreso Argentino de Microbiología, Resumen O53-27882. *Rev Argen Microbiol.* 2010;42(Supl. 1):21.

63. Cattana ME, Fernández MS, Rojas FD, Sosa MDLÁ, Giusiano G. Genotipos y epidemiología de aislamientos clínicos de *Cryptococcus neoformans* en Corrientes, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* Elsevier España, S.L.U.; 2015;47(1):82–3.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the more prevalent *C. neoformans*/*C. gattii* species complex genotypes in the environment and cryptococcosis, in Resistencia and Corrientes city.

One hundred thirty two strains were studied by PCR-RFLP, all of them recovered during 2009 to 2014. Eighty nine strains belonged to clinical isolates and forty three belonged to pigeon droppings and tree debris.

A higher prevalence of VNI genotype among clinical and environmental isolates was observed, with 89% of the isolates.

Eighteen isolates from trees were obtained, 16 (89%) were VNI genotype and 2 (11%) were VGI genotype. Within pigeon droppings only *C. neoformans* strains were recovered. 24 out of 25 (96%) were VNI and 1 (4%) were VNIII (VNI-VNII-VNIV).

Between clinical isolates, 7 were VNII, 2 VNIII (VNII-VNIV) and 77 VNI. Three *C. gattii* strains were obtain, 2 of them VGI genotype and 1 VGII. These genotypes refer less antifungal susceptibility and higher heteroresistance levels. Furthermore, they have been shown to become hypervirulent strains and cause outbreaks. In our environment exists circulation of 3 out of 4 *C. neoformans* genotypes, and the more potentially virulent genotypes of *C. gattii*.

FARMACOGENÉTICA: ACERCÁNDONOS A LA MEDICINA PERSONALIZADA EN EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS.

Lic. Julián Chamorro

Hospital de Infecciosas Dr. Francisco Javier Muñiz

RESUMEN

Introducción: En el campo de la Salud Pública, la Tuberculosis (TB) se encuentra asociada a periodos prolongados de hospitalización, lo cual tiene un impacto directo en los costos destinados a la salud^(1,2). El esquema de tratamiento se basa en la utilización combinada de fármacos como la isoniácida (INH), la rifampicina, el etambutol y la piracinamida. A pesar de su efectividad, los tratamientos con fármacos anti-TB (F-aTB) son responsables de algunos efectos adversos como la hepatotoxicidad. Varios trabajos han encontrado que la INH podría ser la principal responsable de estos desórdenes hepáticos^(1,2,4).

Polimorfismos en las enzimas N-acetiltransferasa 2 (NAT-2) y citocromo P450 2E1 (CYP2E1), involucradas en el metabolismo de INH, pueden estar directamente asociados con el desarrollo de hepatotoxicidad inducida por fármacos anti-TB (HIFA)^(1,3,4). En el caso de NAT-2, se ha observado que algunas mutaciones afectan su actividad y definen tres fenotipos: acetiladores rápidos (AR), acetiladores intermedios (AI) y acetiladores lentos (AL)⁽⁵⁾. El estado AL, ha sido asociado con HIFA en estudios realizados en poblaciones asiáticas^(2,6). Sin embargo, existen controversias debido a la amplia variabilidad en los resultados de estudios previos⁽¹⁻⁴⁾.

Dado que la prevalencia de metabolizadores rápidos y lentos es **variable en distintas poblaciones** nos propusimos estudiar esta distribución en la población argentina y en la población de pacientes que concurren a los Hospitales Públicos, en particular en el marco de la tuberculosis (TB).

Metodología: Se estudiaron 289 pacientes con diagnóstico de TB de acuerdo a los consensos nacionales vigentes, que recibieron tratamiento anti-TB en esquema clásico. Pacientes argentinos e inmigrantes que concurren al Hospital Público.

Criterios de inclusión: Pacientes con TB adultos mayores de 18 años, con referencias sobre su condición de HIV, HCV, HBV, alcoholismo y demás datos clínicos contenidos en la ficha que comenzarán el esquema clásico los primeros dos meses con: isoniácida: 5 mg/kg/d, máximo 300 mg/d, rifampicina: 10mg/kg/d, máximo 600 mg/d, pirazinamida: 20 mg/kg/d, etambutol: 20 mg/kg/d y luego isoniácida y rifampicina 4 meses o más, de acuerdo con la gravedad de la enfermedad o presencia de localizaciones extrapulmonares. Hemodinámicamente estables. Función renal normal definida por un valor de creatinina dentro de los límites normales o con un valor de creatinina que sea normal para ese paciente individual basado en su historia clínica. Test de embarazo negativo en pacientes de sexo femenino en edad reproductiva.

Criterios de exclusión: alergia a la INH, Historia de fallas de tratamiento, multirresistencia a drogas antituberculosas. Pacientes con otras patologías en estudio o conocidas que afectan directamente el hígado. Rechazo a la firma del consentimiento o extracción de sangre.

Se analizaron las variables clínicas y demográficas tomadas en fichas de datos.

Se determinó el perfil acetilador mediante secuenciación del gen de NAT-2. Para el estudio del polimorfismo CYP 2E1*5B se utilizó la técnica PCR-RFLP. La digestión se realizó utilizando la enzima de restricción *Rsa I*.

Se evaluó la asociación de los polimorfismos con el desarrollo de hepatotoxicidad asociada al tratamiento, se construyó una tabla de contingencia y se pudo contrastar la hipótesis de asociación mediante un test de χ^2 ó test exacto de Fisher, según corresponda. Se ajustaron los análisis por posibles factores de confusión utilizando regresión logística. Se obtuvieron los odds ratio con los intervalos de confianza del 95%.

Resultados: La mayoría de los pacientes que concurren al hospital público de la CABA son jóvenes (entre 23 y 36 años), de nacionalidad argentina (48,6%) o boliviana (37,3%), de sexo masculino (62,7%) y con un IMC de 20,7 kg/m² (18,6 – 22,4). Sorprendentemente, se registró una alta tasa de HIFA (24,6%) inducida por el tratamiento con F-aTB.

En la Tabla 1 se muestra la distribución de las frecuencias genotípicas de los distintos polimorfismos de NAT-2 en pacientes con TB. Se observó un alto índice de AL (46,1%) y de AI (40,5%) en los pacientes con TB. Respecto del CYP2E1*5B se observó una mayor prevalencia del genotipo wild type c1/c1 (66,6%).

Como el número de pacientes peruanos y paraguayos no nos permitió realizar análisis estadísticos significativos, en la tabla 2 se compara la distribución de las variables clínicas y demográficas de la población argentina y boliviana.

Al estudiar la distribución alélica de los diferentes SNPs de NAT-2 vimos que los SNPs **C282T** y **G857A** se encuentran con mayor frecuencia en la población boliviana mientras que los SNPs **T341C**, **C481T** y **A803G** son más frecuentes en la población argentina (datos no presentados). Esto se puede observar también en las diferencias significativas encontradas en la distribución genotípica (datos no presentados). En la tabla 3 se muestran los perfiles metabolizadores de todas las enzimas estudiadas entre ambas poblaciones.

Debido a que el número de pacientes de cada nacionalidad es escaso para realizar análisis estadísticos atomizados, se decidió tratarlos como un **único grupo TB**. A dicho grupo se lo dividió en casos (pacientes de TB con HIFA) y controles (pacientes de TB sin HIFA), pero se colocó nacionalidad como variable. Luego, se exploró la asociación entre HIFA y las distintas variables clínicas y demográficas (tabla 4).

Se probó el modelo de herencia con NAT-2 mediante regresión logística (datos no presentados). El modelo se ajusta mejor colocando la variable acetilador como recesiva (AR y AI serán un mismo grupo denominado AR). Al analizar los perfiles metabólicos de las diferentes enzimas, solo encontramos una marcada diferencia en la distribución de AL en aquellos pacientes con HIFA (tabla 5). Aquellas variables con $p < 0.1$, fueron seleccionadas para realizar posteriormente una regresión logística binaria, multivariada, con pasos hacia adelante para la predicción de HIFA: sexo ($p = 0.004$), nacionalidad ($p = 0.035$) y estado acetilador ($p = 0.001$).

Nuestro estudio mostró que el perfil AL (OR=2.715; CI=1.510-4.883, $p = 0.01$), ser mujer (OR=2.350; CI=1.313-4.204, $p = 0.004$) y ser de nacionalidad boliviana (OR=2.032; CI=1.100-3.751, $p = 0.023$) fueron las variables independientes involucradas en la predicción de HIFA. El modelo arrojó un nivel de predicción del 76,9%.

Discusión: En este estudio hemos observamos un 24,6% de desarrollo de hepatotoxicidad inducida por el tratamiento con F-aTB. Esto duplica los datos nacionales reportados previamente (11%, datos propios no publicados) y casi quintuplica los niveles de hepatotoxicidad publicados en Brasil (5,5%) ⁽⁴⁾. Incluso nuestro índice es mayor que India (18,8%), un país pobre con superpoblación (más de 1000 habitantes por Km²) ⁽⁷⁾.

La población boliviana con TB es significativamente más joven que la argentina ($p < 0,001$). Esto podría deberse a la existencia de un gran flujo migratorio de jóvenes bolivianos que vienen a trabajar a Buenos Aires ⁽⁸⁾.

De todas las variables posibles asociadas al desarrollo de HIFA, el perfil AL, el sexo femenino y el origen étnico boliviano resultaron las únicas predictoras de hepatotoxicidad. Otras variables, como el polimorfismo de CYP2E1 o las variables clínicas estudiadas parecerían no tener asociación con HIFA.

En nuestro trabajo hemos podido demostrar que el status AL confiere 2,7 veces más riesgo de desarrollar HIFA que no serlo, convirtiéndose en una variable muy atractiva de estudio y consideración. Por otro lado vimos que ser mujer podría ser un factor de riesgo importante para desarrollar HIFA. Esto coincide con investigaciones previas que han reportado que las mujeres están particularmente predispuestas a desarrollar HIFA ^(9,10). Además, encontramos que la población boliviana tienen una frecuencia mayor de HIFA que la argentina, aun teniendo ambos grupos frecuencias similares del perfil AL. Uno podría especular que los pacientes Bolivianos tendrían además, otra mutación no relacionada con el perfil acetilador u otra variable en asociación, como hábitos o medio ambiente, que permitan explicar esta mayor prevalencia. También se podría entonces pensar que el aumento en los casos de HIFA registrados en nuestro hospital sea a expensas del aumento en la cantidad de pacientes Bolivianos atendidos. Cabe destacar que la distribución alélica de los diferentes SNPs de NAT-2 es significativamente diferente en la población de pacientes argentinos respecto a los bolivianos, que refleja meramente una diferencia étnica.

En definitiva, en el futuro, dado el aumento en los casos de TB en nuestro medio, recomendamos realizar frecuente monitoreo clínico y bioquímico de la función hepática para hallar precozmente HIFA en los AL, pacientes de sexo femenino y de nacionalidad boliviana. Esto ahorraría costos y evitaría la interrupción, cambios y prolongación del tratamiento.

Palabras clave: Tuberculosis, Toxicidad de Medicamentos, N – acetiltransferasa.

BIBLIOGRAFIA

1. Higuchi N, Tahara N, Yanagihara K, Fukushima K, Suyama N, Inoue Y, et al. NAT2 6A, a haplotype of the N-acetyltransferase 2 gene, is an important biomarker for risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Japanese patients with tuberculosis. World J Gastroenterol. 2007 Dec 7;13(45):6003-8.

2. Yamada S, Tang M, Richardson K, Halaschek-Wiener J, Chan M, Cook VJ, et al. Genetic variations of NAT2 and CYP2E1 and isoniazid hepatotoxicity in a diverse population. *Pharmacogenomics*. 2009 Sep;10(9):1433-45.
3. Cho HJ, Koh WJ, Ryu YJ, Ki CS, Nam MH, Kim JW, et al. Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007 Nov;87(6):551-6.
4. Possuelo LG, Castelan JA, de Brito TC, Ribeiro AW, Cafrune PI, Picon PD, et al. Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008 Jul;64(7):673-81.
5. Ohno M, Yamaguchi I, Yamamoto I, Fukuda T, Yokota S, Maekura R, et al. Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000 Mar;4(3):256-61.
6. Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, Gerard N, Krishnamoorthy R, Poloni ES. World-wide distribution of NAT2 diversity: implications for NAT2 evolutionary history. *BMC Genet*. 2008;9:21.
7. Bose PD, Sarma MP, Medhi S, Das BC, Husain SA, Kar P. Role of polymorphic N-acetyl transferase2 and cytochrome P4502E1 gene in antituberculosis treatment-induced hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Feb; 26(2):312-8.
8. Goldberg Alejandro. Abordaje antropológico comparativo en torno a la incidencia del Chagas y la tuberculosis en inmigrantes bolivianos residentes en Barcelona y Buenos Aires, respectivamente. *Eä*, vol. 1, N°3. 2010 Abr. www.ea-journal.com
9. Yee D, Valiquette C, Pelletier M, Parisien I, Rocher I, Menzies D. Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jun 1;167(11):1472-7.
10. Dossing M, Wilcke JT, Askgaard DS, Nybo B. Liver injury during antituberculosis treatment: an 11-year study. *Tuber Lung Dis*. 1996 Aug;77(4):335-40.

TABLAS

Tabla 1. Distribución de las frecuencias genóticas de los polimorfismos de NAT-2 en pacientes con TB (n=289).

	NAT-2						
	G191A	C282T	T341C	C481T	G590A	A803G	G857A
Homocigotatnormal(%)	99	41,5	51,1	51,4	73,6	50,4	62,8
Heterocigota(%)	1	44,1	39,8	39,8	25	39,4	30,6
Homocigotamutado(%)	0	14,4	9,1	8,8	1,4	10,2	7,6

Tabla 2. Comparación de las variables clínicas y demográficas en pacientes con TB según su nacionalidad.

	Argentinos (n=139)	Bolivianos (n=106)	<i>p</i>
Datos demográficos			
Edad(media en años)	31(25-42)	25(22-30)	<0,001
Mujeres(%)	38,8	37,7	0,859
Datos Clínicos			
BMI(media en kg/m ²)	20,3(18,4-22,2)	21,1(19,5-23,1)	0,011
Localización(%)			0,532
Pulmonar	72,7	66,0	
Extrapulmonar	3,6	4,7	
Ambas	23,7	29,2	
Lugar de localización de la TB(%)			0,813
Pleural	35,1	28,6	
Pleural+otros	16,2	20,0	
Otros	48,7	51,4	
Drogas(%)			<0,001
Ninguna	51,1	73,6	
Alcohol	7,9	16,0	
Tabaquismo	5,8	1,9	
Drogas ilícitas	5,8	0,0	
Consumo combinado	29,4	8,5	
Enfermedades asociadas(%)			0,057
Ninguna	72,7	86,8	
Diabetes	3,6	2,8	
Hepatopatías	4,3	2,8	
HIV	7,2	0,9	
Otras	12,2	6,7	
Respuesta al tratamiento(%)			0,051
Buena	78,4	67,6	
Hepatotoxicidad	20,1	32,4	
Intolerancia	1,5	0,8	

Tabla 3. Distribución del perfil acetilador y de las frecuencias genotípicas del polimorfismo de CYP2E1 en pacientes con TB según su nacionalidad.

	Argentinos (n=139, %)	Bolivianos (n=106, %)	p
AR	10,9	17,3	0,336
AI	40,6	39,4	
AL	48,6	43,3	
CYP2E1*5B			0,081
c1/c1	69,6	57,1	
c1/c2	23,9	37,1	
c2/c2	6,5	5,7	

AR: acetilador rápido, AI: acetilador intermedio, AL: acetilador lento

	Hepatotoxicidad		p
	No (n=219)	Sí (n=70)	
Datosdemográficos			
Edad(mediaen años)	28(23-36)	29(23-36)	0,824
Mujeres(%)	32,4	51,4	0,004
Nacionalidad			0,035
Argentinos	51,2	41,2	
Bolivianos	33,2	50,0	
Otra	15,7	8,8	
DatosClínicos			
BMI(mediaen kg/m2)	20,7(18,7-22,2)	21,0(18,5-23,3)	0,446
Localización(%)			0,339
Pulmonar	71,7	64,3	
Extrapulmonar	2,7	5,7	
Ambas	25,6	30,0	
Lugar del localización de la TB(%)			0,763
Pleural	32,2	29,2	
Pleural+otros	22,0	16,7	
Otros	45,8	54,2	
Clasificación del paciente(%)			0,143
Nuevo	80,8	92,6	
Abandono	15,5	4,5	
Recaída	2,3	2,9	

	Hepatotoxicidad		<i>P</i>
	No (n=219)	Si (n=70)	
Drogas(%)			0,015
Ninguna	54,3	75,7	
Alcohol	14,6	5,7	
Tabaquismo	4,1	4,3	
Drogasilicidas	4,6	0,0	
Consumocombinado	22,4	14,3	
Enfermedadesasociadas(%)			0,661
Ninguna	75,8	82,9	
Diabetes	4,2	1,4	
Hepatopatías	3,7	4,3	
HIV	6,8	4,3	
Otras	9,7	7,1	
Tratamientoprevio	19,4	11,4	0,148
Tipodetratamiento(%)			0,950
Autoadministrado	49,1	50,0	
Supervisado	41,6	39,7	
Combinado	9,3	10,3	

Tabla 5. Distribución del perfil acetilador y del polimorfismo de CYP2E1 en pacientes con TB según hayan desarrollado o no hepatotoxicidad.

	Hepatotoxicidad		<i>P</i>
	No (n=219, %)	Si (n=70, %)	
Rápido	14,0	13,0	0,001
Intermedio	46,0	23,2	
Lento	40,0	63,8	
CYP2E1*5B			0,422
c1/c1	68,2	61,4	
c1/c2	26,3	34,3	
c2/c2	5,5	4,3	

AGENTES RICKETTSIALES EN ROEDORES, AVES Y MURCIÉLAGOS DE LA CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES

Gabriel L. Cicuttin, M. Nazarena De Salvo, Diego F. Brambati, Carina Hercolini, Evangelina Aristegui, M. Inés Ardiles, A. Carolina Zotter, Eduardo J. Boeri, Fernando J. Beltrán, Federico E. Gury Dohmen
Instituto de Zoonosis Luis Pasteur

INTRODUCCIÓN

Las rickettsiosis, ehrlichiosis y anaplasmosis son consideradas importantes enfermedades emergentes, debido al incremento en su incidencia y en su expansión geográfica. El número de especies asociadas con enfermedad humana se encuentra en continuo crecimiento, por ende, en principio se debería sospechar de cualquier especie de rickettsia, ehrlichia o anaplasma como un patógeno humano potencial.

Los animales sinantrópicos son definidos como aquellos animales que viven a expensas de los humanos en ámbitos urbanos (aprovechando los hábitats y fuentes de alimentación). Entre los más comunes se pueden citar a roedores, murciélagos y aves. Por otra parte, las aves de corral se siguen criando en barrios de bajos recursos como fuentes de alimentación. De estos tres grupos de animales, el papel de los roedores como reservorios de estas enfermedades es el mejor conocido, quedando mucho por investigar sobre la participación en el ciclo epidemiológico de murciélagos y aves.

Los roedores urbanos (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* y *Mus musculus*) y silvestres son reservorios de numerosos patógenos zoonóticos, incluyendo rickettsias, ehrlichias y anaplasmas. Además juegan un rol muy importante en el ciclo de los vectores que los transmiten.

El tifus murino (tifus de la pulga de la rata) es causado por *R. typhi*, que produce fiebre y una erupción cutánea. Los reservorios más importantes son las ratas domésticas *R. rattus* y *R. norvegicus*. El vector principal es la pulga oriental de la rata *Xenopsylla cheopis*. Se considera además que puede haber ciclos alternativos de transmisión en ambientes suburbanos, implicándose la pulga *Ctenocephalides felis*, felinos domésticos y zarigüeyas (*Didelphis* sp.). La enfermedad está presente en todo el mundo y suele manifestarse en forma de brotes, particularmente en áreas urbanas muy habitadas en las que es fre-

cuenta encontrar ratas. Por otra parte, en 1994 se detecta *Rickettsia felis* en pacientes humanos diagnosticados como enfermos de tifus murino. En el ciclo de esta enfermedad se encuentran implicados la pulga *C. felis*, roedores urbanos, felinos domésticos y zarigüeyas. Este patógeno ya ha sido detectado en humanos de EEUU, México, Francia y Brasil, y en pulgas *Ctenocephalides* sp. en Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay, entre los países sudamericanos.

También los roedores silvestres han sido implicados como posibles reservorios de distintas especies de rickettsias transmitidas por garrapatas (grupo fiebres manchadas): *R. rickettsii* (Fiebre de las Montañas Rocallosas), *R. conorii* (Fiebre manchada del Mediterráneo), *R. sibirica* (Tifus transmitido por garrapatas del Norte asiático), *R. australis* (Tifus transmitido por garrapatas de Queensland), entre otras. Estando pendiente ampliar estudios en roedores urbanos.

Por otra parte, distintas especies de roedores (incluidas *R. rattus*, *R. norvegicus* y *M. musculus*) se encuentran implicadas como posibles reservorios de la familia Anaplasmataceae: género *Anaplasma* (anteriormente Grupo *Anaplasma* –*Ehrlichia*- *phagocytophila*), especialmente *Anaplasma phagocytophila*, siendo causante de la ehrlichiosis granulocítica humana y ehrlichiosis granulocítica canina, las cuales afectan a ciervos, roedores, alces, ardillas, caballos, llamas, perros, ovejas y humanos, transmitidas por las garrapatas del género *Ixodes*. La distribución del género *Anaplasma* es mundial. También en roedores se ha encontrado la especie *Ehrlichia muris* (en Japón, la cuál no se encuentra asociada a enfermedad y se transmite por garrapatas del género *Haemaphysalis*), *E. chaffeensis* (productor de la ehrlichiosis monocítica humana) y *A. platys* (posible patógeno humano).

El rol que desempeñan los murciélagos como reservorios de estas enfermedades no está bien establecido. Se han realizado algunos estudios serológicos sobre rickettsiosis en murciélagos, especialmente en Brasil, que han arrojado una positividad menor al 10 %. Esto indica que estos animales han estado en contacto con los patógenos (gracias a las picaduras de los vectores como pulgas y garrapatas), aunque se desconoce su papel como reservorios. Además en garrapatas recolectadas sobre murciélagos también se ha detectado rickettsias. Dentro de la flia. Anaplasmataceae se encuentra también *Neorickettsia risticii* (el agente causal de la ehrlichiosis monocítica equina (fiebre equina del Potomac), enfermedad no zoonótica, con un complejo ciclo natural, que tiene como reservorios posiblemente a murciélagos y aves insectívoras.

El papel que tienen las aves ha sido aún menos determinado, involucrándose principalmente en la diseminación del vector garrapata. En ese sentido,

especialmente las aves migratorias jugarían un papel central por la diseminación de garrapatas. En cuanto a la competencia como reservorio muchas cuestiones aún no se entienden, posiblemente las aves sean competentes en transmitir rickettsias, ehrlichias y anaplasmas a las garrapatas, pero no serían reservorios de estas bacterias. Las aves que se alimentan sobre el suelo, como las aves de corral, tienen más probabilidades de estar infestadas con garrapatas que otras especies.

En la República Argentina, aún hay pocos datos de la real incidencia de estos patógenos humanos, su ciclo epidemiológico y especialmente el papel de los animales como reservorios. Se han detectado distintas rickettsias (*R. rickettsii*, *R. parkeri* y *R. massiliae*) y ehrlichias (*Ehrlichia chaffeensis*) asociadas a cuadros clínicos en humanos. También se describieron otras especies en garrapatas y hospedadores.

El objetivo de nuestro estudio fue detectar la presencia de rickettsias, ehrlichias, anaplasmas y neorickettsias en roedores, aves y murciélagos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo. Durante los años 2011 y 2012 se recolectaron muestras de roedores urbanos, de murciélagos y de aves silvestres y de corral, procedentes de la CABA.

Los roedores fueron capturados mediante el uso de trampas de captura viva tipo jaula y tipo Sherman, eutanasiados, identificados hasta nivel de especie y necropsiados. Los murciélagos fueron enviados por el público para diagnóstico de rabia a nuestra institución (sólo se utilizaron animales negativos a rabia). De cada roedor y murciélago se colectó un pool de órganos (bazo, hígado y pulmón), conservándose todas las muestras a -70° C.

Las aves silvestres fueron capturadas con redes de niebla. Para muestrear las aves de corral se contó con el consentimiento de los propietarios. A todas las aves se les extrajo sangre de la vena alar o yugular y se conservó una gota de la misma en papel nucleico o en un microtubo con anticoagulante EDTA, conservándose las muestras en un lugar seco a temperatura ambiente o a -70°C, respectivamente.

Extracción de ADN. La extracción del ADN desde las muestras se realizó mediante columnas de extracción para tejidos ZR Genomic DNA Tissue

Mini Prep (Zymo Research, Irvine, USA). En cada lote extraído se utilizó un control negativo de extracción (agua libre de nucleasas).

PCR. A todas las muestras se les realizó dos PCRs, una para la detección de un fragmento del espacio intergénico 23S-5S del género *Rickettsia* y otra para un fragmento del 16S rRNA de la Familia Anaplasmataceae (géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia*), incluyéndose un control negativo (agua libre de nucleasas) y un control positivo (clon de *R. conorii* y *A. bovis*, respectivamente).

Secuenciación. Los productos amplificados fueron purificados con Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Irvine, EEUU) y secuenciados en un secuenciador 3500 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) en el Servicio de Neurovirosis del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Argentina). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias disponibles en GenBank, mediante la utilización del software BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

RESULTADOS

Se obtuvieron muestras de 24 roedores identificados como pertenecientes a la especie *Rattus norvegicus* (nombre común: rata común, rata noruega, rata parda). Los animales fueron capturados en Villa N° 20, Plaza de Maniobras del Ex Ferrocarril Urquiza (Chacarita) y Barrio “Rodrigo Bueno”. Por otra parte, se procesaron 21 roedores identificados como pertenecientes a la especie *Mus musculus* (nombre común: ratón doméstico común). Los animales fueron capturados en Villa N° 20 y Reserva Ecológica Costanera Sur.

Los murciélagos procesados (45) pertenecieron a la especie *Tadarida brasiliensis* (murciélago cola de ratón).

En cuanto a las aves, se procesaron 9 aves de corral y 36 aves silvestres. Los animales fueron capturados en Villa N° 20, Minizoo de la Escuela N° 6 (DE 21) y en la Reserva Ecológica Costanera Sur (Tabla 1).

Tabla I. Detalle de las especies de aves muestreadas

Nombre científico	Nombre común	Cantidad
<i>Furnarius rufus</i>	Hornero	1
<i>Lepidocolaptes angustirostris</i>	Chincherchico	1
<i>Sturnus vulgaris</i>	Estorninopinto	2
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Zorzalchalchalero	3
<i>Turdus rufigenis</i>	Zorzalcolorado	8
<i>Zenaidura macroura</i>	Torcaza	4
<i>Zonotrichia capensis</i>	Chingolo	4
<i>Gallus gallus domesticus</i>	Gallodoméstico	9
<i>Anser anser domesticus</i>	Gansodoméstico	4
<i>Elaenia parvirostris</i>	Fiofiopico corto	1
<i>Poospiza nigrorufa</i>	Sietevestidos	1
<i>Larus dominicanus</i>	Gaviotacocinera	1
<i>Columba livia</i>	Palomadoméstica	6

Todas las muestras procedentes de roedores y aves resultaron negativas para ambas PCRs. En los murciélagos *T. brasiliensis*, una muestra resultó positiva a la PCR para el género *Rickettsia* y otra resultó positiva a la PCR para la Familia Anaplasmataceae (Tabla II).

Tabla II. Resumen de resultados

	Total	Rickettsia spp.		Flia. Anaplasmataceae	
	n	n	%	n	%
Avessilvestres	36	0	0	0	0
Avesdecorral	9	0	0	0	0
<i>R. norvegicus</i>	24	0	0	0	0
<i>M. musculus</i>	21	0	0	0	0
<i>T. brasiliensis</i>	45	1	0,02	1	0,02

Las dos muestras positivas de los murciélagos pudieron ser secuenciadas. La secuencia que resultó positiva a la PCR para la Familia Anaplasmataceae se determinó como *Neorickettsia risticii*, resultando con un 100 % de

identidad con un hallazgo previo en *T. brasiliensis* de CABA. Mientras que la secuencia positiva a la PCR para el género *Rickettsia* tiene aproximadamente 94 % de identidad con respecto a otras rickettsias endosimbiontes halladas en la base de datos Genbank.

DISCUSIÓN

Según nuestro conocimiento de la bibliografía, esta es la primera vez que se reporta *Rickettsia* sp. en murciélagos *T. brasiliensis* a nivel mundial y además es la segunda detección de *N. risticii* para Argentina.

La no detección de estos patógenos en aves se condice con los nulos antecedentes en la bibliografía. Por otra parte, la no detección en roedores podría implicar la no circulación de estos patógenos en estos hospedadores en nuestro medio. De todas formas, se deberá analizar un número mayor de muestras y especies para poder esclarecer la situación de estos patógenos en el área.

Las rickettsias endosimbiontes, tradicionalmente halladas en artrópodos, recientemente también han sido asociadas en hospedadores no artrópodos (como sanguijuelas, hidras, amebas, haplosporidios y ciliados). Estas rickettsias se relacionan filogenéticamente en un grupo separado dentro de la familia Rickettsiaceae y poco se sabe acerca de la virulencia o la contribución con sus hospedadores. Por otra parte, estudios realizados con garrapatas infectadas con rickettsias endosimbiontes no demostraron ser infectantes a hospedadores vertebrados. El hallazgo en el presente trabajo es inédito y deberá ser considerado con precaución hasta se clarifique más al respecto.

N. risticii fue detectada por primera vez en 1979 en Estados Unidos. Posteriormente fue sólo reportada en Canadá, Brasil, Uruguay y en 2013 en Argentina. Los reservorios vertebrados donde se encontró fueron caballos, murciélagos y golondrinas, e invertebrados como caracoles e insectos acuáticos. Estudios previos en otras especies de murciélagos reportaron un nivel de infección del 11,1 al 60 % de los individuos. En CABA se encontró en el 10 % de los murciélagos *T. brasiliensis* estudiados. Las discrepancias entre los hallazgos pueden ser debido al número de muestras analizadas, así como la época del año donde se muestrearon los animales. Dado el impacto en medicina veterinaria, por ser causante de enfermedad en equinos, la nueva detección de *N. risticii* circulando en el área pone de relieve su endemidad

y la necesidad de monitorear los casos sospechosos en equinos para lograr un control de esta patología.

En conclusión, con el desarrollo actual de los métodos moleculares de detección, el número de especies de rickettsias, ehrlichias y anaplasmas asociadas con animales sinantrópicos se encuentra en progresión constante, aunque mucho de estos patógenos no se consideran actualmente zoonóticos se deberían tener en cuenta como potencialmente riesgosos para la salud humana. Por lo tanto, es importante conocer las especies que están circulando por las poblaciones de animales sinantrópicos, que tienen un contacto íntimo con humanos en entornos urbanos. Los veterinarios y los médicos deben tener presente la importancia de las enfermedades rickettsiales y su circulación en Argentina.

REFERENCIAS

1. Acha P, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. OPS. 2003.
2. Alekseev A, Dubinina H, Semenov A, Bolshakov C. Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. J Med Entomol. 38(4):471-4. 2001.
3. Bjöersdorff A, Bergström S, Massung R, Haemig P, Olsen B. Ehrlichia-Infected Ticks on Migrating Birds. Emerging Infectious Diseases. 7(5):877-9. 2001.
4. Boostrom A, Beier M, Macaluso J, Macaluso K, Sprenger D et al. Geographic Association of *Rickettsia felis*-Infected Opossums with Human Murine Typhus, Texas. Emerging Infectious Diseases. 8(6): 549-54. 2002.
5. Chae J, Yu do H, Shringi S, Klein T, Kim H et al. Microbial pathogens in ticks, rodents and a shrew in northern Gyeonggi-do near the DMZ, Korea. J Vet Sci. 9(3):285-93. 2008.
6. 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.
7. Civen R, Ngo V. Murine typhus: an unrecognized suburban vectorborne disease. Clin Infect Dis. 46(6):913-8. 2008.
8. Comer A, Paddock C, Childs J. Urban zoonoses caused by *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia* and *Rickettsia* species. Vector Borne Zoonotic Dis. 1(2): 91-118. 2001.
9. D'Auria S, Camargo M, Pacheco R, Savaní E, Días M, da Rosa A, de Almeida M, Labruna M. Serologic survey for rickettsiosis in bats from Sao Paulo city, Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 10(5):459-63. 2010.
10. Elfving K, Olsen B, Bergström S, Waldenström J, Lundkvist A et al. Dissemination of spotted fever rickettsia agents in Europe by migrating birds. PLoS One. 5(1): e8572. 2010.

11. García-García J, Portillo A, Núñez M, Santibáñez S, Castro B et al. A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. Am J Trop Hyg. 82(4): 691-2. 2010.
12. Graham R, Mainwaring M, Du Feu R. Detection of spotted fever group *Rickettsia* spp. from bird ticks in the U.K. Medical and Veterinary Entomology. 24(3):340-3. 2010.
13. 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
14. Ioannou I, Chochlakis D, Kasinis N, Anayiotos P, Lyssandrou A et al. Carriage of *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* and *Anaplasma* spp. by endemic and migratory wild birds and their ectoparasites in Cyprus. Clin Microbiol Infect. 2:158-60. 2009.
15. 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
16. Labruna M. Ecology of rickettsia in South America. Ann N Y Acad Sci. 1166:156-66. 2009.
17. 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.
18. Nava S, Elshenawy Y, Ereemeeva M, Sumner J, Mastropaolo M, Paddock C. *Rickettsia parkeri* in Argentina. Emerg Infect Dis, 14(12):1894-7. 2008.
19. Olson J, Paddock C. Emerging rickettsioses. The Infectious Disease Review 1(2): 113-114. 1999.
20. 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.
21. 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., 78 (4), pp. 687-692. 2008.
22. Parola P, Raoult D. Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. Ticks and Tickborne Diseases – CID: 32. 2001.
23. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 10: 694-719. 1997.
24. Reeves W, Streicker D, Loftis A, Dasch G. Serologic Survey of *Eptesicus fuscus* from Georgia, USA for *Rickettsia* and *Borrelia* and laboratory transmission of a *Rickettsia* by bat ticks. Journal of Vector Ecology. Vol. 31 N° 2. 2006.
25. Ripoll C, Remondegui C, Ordonez G, Arzamendi 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.
26. Romer Y, Seijo A, Crudo F, Nicholson W, Varela-Stokes A et al. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, Argentina. Emerging Infectious Diseases. 17(7):1169-73. 2011.
27. Santos-Silva M, Sousa R, Santos A, Melo P, Encarnação V et al. Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. Exp Appl Acarol. 39(3-4):331-8. 2006.
28. Seijo A, Picollo M, Nicholson W, Paddock C. Fiebre manchada por rickettsias en el Delta del Paraná. MEDICINA (Buenos Aires). 67: 723-726. 2007.

29. Sorvillo F, Gondo B, Emmons R, Ryan P, Waterman S et al. A suburban focus of endemic typhus in Los Angeles County: association with seropositive domestic cats and opossums. *Am J Trop Med Hyg.* 48(2):269-73. 1993.
30. Tamí I. Ehrlichiosis humana: Ehrlichia trombocítica en sangre periférica. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* Vol. 23 N° 2. 2003.
31. 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.
32. Venzal J, Nava S. El género Rickettsia como agente de zoonosis en el Cono Sur de Sudamérica. *Rev Med Urug.* 27:98-106. 2011.
33. Vitale, G., Mansueto, S., Rolain, J., Raoult, D. *Rickettsia massiliae* human isolation. *Emerging Infectious Diseases.* Vol. 12. No. 1: 174-175. January 2006.

ABSTRACT

Rickettsiosis, ehrlichiosis and anaplasmosis are considered important emerging diseases due to increase in incidence and geographical expansion. The synanthropic animals are defined as those animals that live at the expense of humans in urban areas (using habitats and power supplies), like rodents, bats and birds. Of these three groups of animals, the role of rodents as reservoirs of these diseases is the best known, while the role of birds and bats has been scarcely studied. The aim of our study was to detect the presence of these pathogens in synanthropic animals from Buenos Aires city.

Samples from *Rattus norvegicus* rats (24), *Mus musculus* mice (21), *Tadarida brasiliensis* bats (45), poultry (9) and wild birds (36) were obtained. Samples were analyzed by two PCRs for detection of the genus *Rickettsia* and *Anaplasmataceae* family (genus *Ehrlichia*, *Anaplasma* and *Neorickettsia*).

All samples from rodents and birds were negative for both PCRs. In samples from *T. brasiliensis* bats, one was positive by PCR for the genus *Rickettsia* with an identity of 94% with other endosymbionts rickettsiae, and another sample was positive by PCR for the *Flia. Anaplasmataceae*, resulting with 100% identity to *Neorickettsia risticii*.

Our finding of *Rickettsia* sp. in bats is novel and should be considered with caution until clarify more about it. Moreover, in Buenos Aires city there are previous reports of *Neorickettsia risticii* in 10% of bats. In conclusion, the current development of molecular methods, the number of species of *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* and *Neorickettsia* associated with synanthropic animals is in constant progression, although much of these pathogens are not currently considered zoonotic should be taken into account as potentially

risky to human health. Therefore, it is important to know the species that are circulating populations of synanthropic animals, which have a close contact with humans in urban environments.

TRATAMIENTO CON ACETIL-L-CARNITINA Y NICOTINAMIDA EN NIÑOS EN RIESGO DE DIABETES TIPO 1. ESTUDIO LONGITUDINAL DE SU EVOLUCIÓN

Dr. Juan C. Cresto

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET), Endocrinología,
Htal. De Niños R. Gutierrez.

INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que hermanos de niños con diabetes tipo I tienen entre el 6-10% de riesgo potencial de enfermar. El hallazgo de anticuerpos específicos para diabetes tipo 1 incrementa el valor estadístico de enfermar. Además, si los familiares en primer grado, sanos, de un paciente con diabetes tipo 1 comparten con éste la base genética predisponente (sobre todo los alelos HLA DQB1 *0302/*0201 de alta susceptibilidad) aumenta en ellos el riesgo de diabetes.

Finalmente, cuando a los marcadores inmunológicos y a los genotipos de susceptibilidad se le asocian parámetros metabólicos que indican una disminución en la masa de insulina con alteración en su dinámica de secreción junto a la elevación de los valores de la glucemia, se puede postular que se está en presencia de una diabetes subclínica.

Uno de los requerimientos para tener una respuesta objetiva respecto de un tratamiento es que el grupo en estudio sea lo más homogéneo posible. Por eso nosotros seleccionamos entre 64 hermanos sanos de diabéticos insulínodpendientes un grupo de niños; de ellos 2 desarrollaron una diabetes clínica antes de ingresar al tratamiento y requirieron insulina, demostrando en el corto tiempo de observación que la población seleccionada era de muy elevado riesgo diabético. De los 9 niños restantes 1 desarrolló diabetes clínica a los 10 meses de iniciado el tratamiento y los ocho restantes se presentan en este estudio.

Aporte combinado de acetil-L-carnitina y nicotinamida

Algunos estudios experimentales permiten deducir que la acetil-L-carnitina y nicotinamida son complementarias en su comportamiento. El tratamiento combinado en ratones de la cepa C57BL/6J inyectados con múltiples

subdosis de estreptozotocina (que produce una diabetes autoinmune) permitió revertir la diabetes inducida normalizando la glucemia, recuperar los niveles de insulina plasmática y la masa disminuida de células beta. Además logró disminuir la agresión inmune sumamente incrementada⁽¹⁾.

En otro trabajo sobre ratas GK, se demostró que el tratamiento combinado con el agregado de ácido α -lipoico y biotina producía un aumento de la masa y actividad de los complejos I y II de la cadena respiratoria en la mitocondria⁽²⁾ incrementando la actividad de carnitina palmitoil-transferasa 1 (CPT1).

Recientemente se publicó un trabajo en ratas con una dieta rica en sucrosa (que produce resistentes a la insulina) en las cuales el tratamiento combinado redujo la resistencia e incrementó la secreción de insulina⁽³⁾. En ellas se determinó una disminución de triglicéridos y de la esteatosis hepática, un incremento de la velocidad de desaparición de la glucosa plasmática (K_g) con normalización de la glucemia. Se observó además la normalización de CPT1 con disminución de la ACC y ácido graso sintasa sumamente elevadas en este modelo experimental.

Las consideraciones desarrolladas más arriba justifican el tratamiento instituido y son aplicables a la prediabetes autoinmune, demostrada en su evolución por la determinación de anticuerpos específicos y los cambios metabólicos producidos.

Método de selección de los niños

Los niños fueron seleccionados para su estudio por ser hermanos o cosanguíneos de pacientes diabéticos en tratamiento y tener anticuerpos positivos específicos para diabetes tipo 1. Se determinaron anticuerpos para glutamato decarboxilasa (GADA), insulina/proinsulina (IAA/PAA) o tirosina fosfatasa 2 (IA2A). La presencia de un solo anticuerpo es suficiente demostración de autoinmunidad para diabetes.

Diversos estudios han objetivado que en las formas con “alto riesgo” el 25-50% de los pacientes evolucionan en 5 años hacia la diabetes. El estudio más contundentes en sus estimaciones sobre diabetes tipo 1 en una población con consanguinidad directa, (hijos, hermanos y primos hermanos de diabéticos tipo 1) es el DPT1 (Diabetes Care 31: 146-150, 2008). El mismo es un análisis posterior del tratamiento con insulina oral o subcutánea emprendida varios años antes. En este estudio se considera de “alto riesgo” una PTEVG que muestre un primer pico de secreción de insulina disminuido, ubicado dentro del primer cuartilo; o una PTOG cuyo valor de glucemia se encuentre por arriba del cuartilo 3.

En nuestros niños se determinó durante una prueba de tolerancia endovenosa a la glucosa (PTEVG) el valor del primer pico de secreción de insulina. Los demás parámetros se obtuvieron en la misma prueba permitiendo seguir la evolución de los pacientes. Los parámetros que se indican a continuación representan el límite que consideramos representa una evolución hacia la diabetes clínica. Una excepción es el HOMA-IR que indica resistencia a la insulina y cuyo valor no está establecido en la diabetes insulín dependiente. El valor indicado es tomado de Cutfield ⁽⁴⁾ para una población pediátrica.

Primer pico de secreción de insulina (1+3) $\leq 48 \mu\text{U}$

Area integrada de secreción de insulina (0-60) $\leq 200 \mu\text{U}$

Pendiente (K_g) ≤ 1.4

$\mu\text{U (ins.total)} \times K_g$

HOMA-IR > 1.60

$\log_n (\text{área insulina}) \times K_g \leq 15$

HbA1c > 6.4

Nosotros evaluamos en los niños el primer pico de secreción de insulina (1+3 min) en una PTEVG. Se seleccionaron para Control o Tratamiento aquellos pacientes con un primer pico por debajo del percentilo 3 ($48 \mu\text{U}$ de insulina). El primer pico es tomado por todos los autores como el parámetro que define la pérdida de sensibilidad a la glucosa y es una señal de “alto riesgo” en la evolución hacia la diabetes. En ellos se determinó cada 4 meses si este primer pico caía en forma progresiva a partir de la determinación inicial. Este período de estudio no debe ser considerado en forma rígida debido a que la enfermedad puede evolucionar rápidamente y en aquellos niños en donde se sospeche una evolución rápida los estudios podrán ser realizados en forma más próxima.

Los niños seleccionados se distribuyeron en forma randomizada en dos grupos: no tratados y tratados. El tratamiento consiste en el aporte de 50 mg/Kg de acetil-L-carnitina y 25 mg/Kg de nicotinamida, en 3-4 tomas al día de acuerdo al peso corporal. Los padres y los niños conocen la medicación y sus efectos. No hay placebo y el estudio y tratamiento son abiertos. No existen riesgos ni intolerancia a las dosis indicadas y no se conocen reportes al respecto.

El modelo estadístico fue de “intención de tratamiento” (ITT) ⁽⁵⁾ que permite cambiar de grupo sin que estadísticamente se considere. Esto permite que un niño no tratado pase a ser tratado cuando vulnera ciertas condiciones

establecidas y evita que se transforme en un “control no tratado” al cual se lo espera hasta que desarrolle la enfermedad, algo éticamente inaceptable en niños. Más todavía cuando el tratamiento carece de riesgos.

La Asociación Americana de Diabetes estableció que glucemias en ayunas mayores de 110 mg% significan hiperglucemia y que valores mayores de 125 mg% representan diabetes clínica. Es aceptado además que una PTOG con glucemias mayores de 126 mg% a las dos horas significan pruebas patológicas ⁽⁶⁾ y que en la PTEVG el valor a los 60 min debe ser igual o menor a la glucemia en ayunas. Por todo ello consideramos que un valor a los 60 min mayor de 126 mg% es patológico, expresa alto riesgo y debe ser tratado.

Se utilizó la fórmula “ $\log_n$ (área de insulina) $\times K_g$ ” como una expresión funcional. Esto es, la respuesta en la velocidad de desaparición de la glucosa (K_g) que induce la masa de insulina secretada durante la prueba de tolerancia endovenosa a la glucosa. Se estableció durante su elaboración que un valor menor de 15 implica “riesgo” y representa una evolución hacia la Diabetes Clínica.

El área integrada de secreción de insulina es variable. El valor adoptado representa una secreción tónica de insulina (sin picos de secreción) que se observa en la diabetes de reciente aparición. Por eso representa una variable extrema a la que no se debe esperar para iniciar el tratamiento.

Si durante la evolución se agregan uno o más de los siguientes parámetros, se lo debe considerar suficiente para un cambio de grupo (de no tratado a tratado):

A – Ingreso al estudio

- Hermano o consanguíneo de paciente diabético tipo 1.
- Con anticuerpos positivos.
- Primer pico de secreción de insulina $\leq 48 \mu\text{U}$

B – Pacientes no tratados que se deben tratar cuando se agrega 1 de los siguientes parámetros

- Glucemia basal $> 110 \text{ mg\%}$.
- Glucemia a los 60 min en la PTEVG $> 126 \text{ mg\%}$.
- Pendiente de desaparición de glucosa (K_g) ≤ 1.41
- Ecuación ≤ 15
- HbA1c > 6.4

El tratamiento de estos niños y su respuesta al mismo han sido publica-

dos previamente (7), pese a que el estudio no había cumplido con el período de 5 años tomado internacionalmente para considerar en forma estadística la evolución hacia la diabetes clínica. En su evolución todos los niños terminaron siendo tratados y la publicación fue un adelanto para informar acerca de la respuesta y la tolerancia del tratamiento propuesto.

Estudio longitudinal de los niños tratados

El estudio se desarrolló a lo largo de 5 años, en donde de acuerdo a las condiciones conocidas y relatadas más arriba, es esperada una evolución diabética espontánea mayor del 25%. Se aportan los datos anteriores más relevantes y los estudios posteriores en cada uno de los 8 niños. Las fechas y las pruebas están en idioma Ingles (se pide disculpas por no haberlas transcritas).

En el caso de la niña BL el tratamiento fue suspendido luego de haberse mantenido durante largo tiempo a la mitad de la dosis estipulada. La niña dejó la consulta entre los años 2003 y 2006. La madre por su cuenta le siguió aportando el tratamiento a la mitad de la dosis. Al volver la niña a la consulta (21/7/2006) se incremento la dosis ajustándola de acuerdo al Protocolo. Con esta nueva dosis la niña presentó hiperinsulinismo con aumento del HOMA-IR que requirió bajar la dosis de acetil-L-carnitina y nicotinamida (5/9/2007, insulina secretada durante la PTEVG: 4753 μ U; HOMA-IR: 6.53). La niña con la mitad de la dosis recuperó valores normales de insulina y HOMA-IR y el tratamiento fue suspendido el 14 de Agosto de 2011. La paciente sigue asintomática.

I - PACIENTES QUE SUSPENDIERON EL TRATAMIENTO Y CONTINÚAN CONTROLADOS

(con ----- se subrayan los controles posteriores y con los controles actuales)

Name	Date of study	Date of treatment	FPIR (μ U)	"K _g "	Insulin area (μ U)	HOMA-IR	Equation	Basal glucose (mg%)	60min glucose (mg%)	Hb A1c
B.L. 4y8m	2/28/00		30							
	2/16/01	8/6/01	88	1.34	526	0.63	8.4	64	57	
	8/4/03	"	31	2.88	774	2.93	19.16	88	79	
	2/8/11	"	36	1.71	823	0.29	11.48	68	94	
DQB1 0201/0604	6/14/11	"	61	3.34	1258	0.74	23.84	59	64	
		ST-8/14/11								
	10/11/11		80	2.23	2154	1.35	15.33	71	108	
	12/21/12		116	2.88	1865	0.92	21.69	71	129	5.5

Name	Dateof study	Dateof treatment	FPIR (μU)	"Kg "	Insulin area (μU)	HOMA-IR	Equa-tion	Basal glucose (mg%)	60min glucose (mg%)	Hb A1c
O.M. 6y5m	10/6/09	11/4/09	47	3.33	778	0.44	22.17	97	121	6.0
	5/17/11	"	--	4.27	430	0.74	25.89	112	114	
	10/25/11	"	99	3.89	1324	1.99	27.96	99	101	
DQB1 0301/060	6/12/12	ST-10/10/12	123	3.81	1390	1.96	27.57	117	109	6.2
PAA:Pos.	6/4/13		81	3.90	1327	2.06	28.04	110	95	6.3
PVT.S. 8y10m	10/31/07	11/13/07	<2	0.92	611	0.40	5.90	56	169	
DQB1	3/17/08	"	41	2.18	474	0.56	13.19	82	74	
	1/5/09	"	38	4.86	749	0.56	32.17	76	72	7.0
0302/0402	12/29/09	"	186	6.14	1650	1.68	45.49	80	56	
GAD:0,75		ST-3/1/10								5.1
IA2A:0,04	9/21/10		100	3.27	1756	2.26	24.43	90	111	
PAA:0,65	7/19/11		126	2.13	1699	2.13	15.84	74	82	5.4
	7/2/13					2.62		105		5.1
H.P. 17y4m	4/26/07	4/26/07	9	0.88	1152	1,05	6.20	72	152	
DQB1	8/16/07	"	36	1.06	574	0,39	7.73	73	169	
0302/0402		ST-9/1/09								
PAA:8,17	9/21/10		49	2,07	1429	1,64	15,04	83	162	5.2
	7/16/13					1,11		88		4.8

ST: sin tratamiento

El niño OM normalizó rápidamente los parámetros metabólicos y al cabo de 2 años de tratamiento le fue suspendida la medicación. En la actualidad continúa asintomático.

El niño PVTS presentó inicialmente valores sumamente alterados que se recuperaron luego de 1½ año de tratamiento. En ese momento comenzó con síntomas de hipoglucemia (valores en la PTEVG de 50 mg%) y la dosis fue disminuida a la mitad. Como había normalizado todos sus parámetros metabólicos y continuaba asintomático en Marzo 2010 se suspendió el tratamiento hasta la actualidad.

El niño HP que tenía en el momento de su ingreso 17 años no cumplió con una dieta normal. Solamente mantenía el tratamiento por decisión de los padres. En Septiembre del 2009 abandonó el tratamiento y volvió a la consulta en Septiembre de 2010, momento en que se lo volvió a estudiar pero sin tratarse. Su ejemplo es una muestra del efecto residual del tratamiento ya observado en la niña BL.

II - PACIENTES QUE CONTINUAN EN TRATAMIENTO Y SIGUEN CONTROLADOS

(con ----- se subrayan los controles de evolución y con los controles actuales)

Name	Date of study	Date of treatment	FPIR (μU)	"K _g "	Insulin area (μU)	HOMA-IR	Equation	Basal glucose (mg%)	60min glucose (mg%)	Hb A1c
A.N. 15y DQB1 0201/0201 GAD:0,01 PAA:1,50 IA2A:1,05	12/21/10	4/20/10	29	1.84	1354	1.05	13.27	73	73	5.4
	12/13/11	"	75	1.87	627	0.23	12.04	72	<u>141</u>	---
		"								
	5/24/12	"	51	2.39	1103	0.62	16.74	66	97	5.6
	8/24/12	"	51	1.93	977	0.81	13.28	85	-----	5.9
	1/8/13	"	71	1.87	1315	0.82	13.43	67	125	6.3
A.F. 7y DQB1 0302/0201 PAA:6,35	3/1/10	5/12/10	48	4.19	752	1.67	27.75	103	102	5.8
	5/10/11		108	2.48	1198	2.40	17.58	110	112	7.1
	9/20/11		77	3.02	776	1.87	20.09	119	111	7.1
	6/9/12	"	78	1.68	1086	2.33	11.74	98	125	6.4
	11/13/12	"	91	2.39	1504	2.28	17.48	112	121	5.9
	4/9/13	"	70	4.56	1023	2.22	31.60	113	111	7.9
R.U. 5y9m DQB1 0402/0302 IA2A:1,41	5/12/09	10/16/08	<2	2.48	156	0.43	12.52	102	103	6.5
	4/26/11	"	51	3.84	637	1.17	24.79	108	106	8.3
	8/9/11	"	58	3.29	668	1.72	21.40	<u>127</u>	136	7.4
	10/18/11	"				1.20		125		7.0
	12/6/11	"	50	2.54	724	1.75	16.73	107	130	7.3
	5/15/12	"	80	2.10	807	1.49	14.06	156	170	6.7
P.M. 7y5m DQB1 00302/0103 PAA:0,65	9/4/12	"	89	3.10	838	1.30	20.86	118	---	7.1
	1/15/13	"	72	2.74	790	1.33	18.28	120	153	7.7
	5/7/13	"	70	3.03	756	1.20	20.08	117	144	6.1
	7/12/11	11/4/09	17	2.43	259	0.37	13.50	80	146	5.9
	11/1/11	"	27	1.53	391	0.90	9.13	100	140	6.6
	6/24/12	"	14	2.66	596	1.06	16.99	108	154	6.5
	10/16/12	"	47	3.74	779	2.58	24.90	130	130	7.1
	3/05/13	"	34	1.60	516	1.26	9.99	108	161	7.2
	7/23/13	"	44	1.23	768	2.66	8.17	124	178	6.9

§ Glucosuria positiva

Entre los niños que continúan en tratamiento, el paciente AN evoluciona favorablemente y se espera la próxima prueba para saber si se le puede sus-

pende la medicación. A su vez el niño AF que evolucionaba favorablemente, en la última PTEVG sufrió un cambio cuyo origen no conocemos. Se han negativizado los anticuerpos y por ende, el cambio no parece depender de un incremento en la agresión inmune.

El niño RU presentó en su evolución ausencia del primer pico de secreción de insulina asociado a un valor total durante la PTEVG menor de 200 μ U, solo observable en los diabéticos de reciente diagnóstico con secreción residual de insulina, con 8.3 de HbA1c asociado a glucosuria. Pese a estos datos metabólicos el niño permaneció asintomático y siguió creciendo normalmente, por lo que continuó con su tratamiento sin recurrir a insulina. El niño se recuperó posteriormente, normalizó sus valores de primer pico de secreción de insulina y solo queda mejorar sus valores de glucemia.

El niño PM es el más difícil de evaluar porque se encontraba con los valores de glucemia límites para el inicio de un tratamiento, que se espera tenga una evolución favorable cuando se cumple con las condiciones establecidas. Comenzó con una hiperglucemia manifiesta en una PTEVG donde no se pudo determinar la insulina (210 mg% a los 60 min). A pedido de los padres y la médica tratante se comenzó con el tratamiento. El niño a evolucionado lentamente, sin alterar su crecimiento y haciendo una vida normal, con recuperación de la cantidad total de insulina secretada durante la PTEVG.

EVALUACIÓN DE LOS ESTUDIOS

Consideramos a partir de los estudios experimentales en los ratones que el tiempo mínimo requerido para una evolución favorable es de 1 año previo al desarrollo de una diabetes clínica. Esto significa que aquellos niños cuyo diagnóstico fue tardío, no deben ingresar al tratamiento. Por el contrario, aquellos niños que se encuentran en tratamiento por un lapso mayor de 1 año, deben continuar con el tratamiento aún cuando sus resultados metabólicos sugieran su interrupción. Estas consideraciones que se ajustan bien al niño RU pierden relevancia cuando se analiza al niño PM. Ambos son pacientes que en condiciones normales (atendidos en consultorio y no dentro de un proyecto en el cual existe un riguroso control) estarían tratados con insulina. La duración de los tratamientos en todos los niños se resumen en el Cuadro presentado.

Según se puede observar la respuesta individual es variable, pero los pacientes que continúan en tratamiento no son los que presentaron valores

DURACIÓN DEL TRATAMIENTO**Pacientes que suspendieron la medicación**

	Duración del Tratamiento	Sin Medicación
BL	2 a 10 m (dosis total) 4 a 4 m (1/2 dosis)	2 años
OM	2 a 11 m	10 meses
HP	1 a 10 m	3 años 11 meses
PVTS	1 a 9 m (dosis total) 8 m (1/2 dosis)	3 años 7 meses

Pacientes en tratamiento

	Duración del tratamiento
AN	3 años 4 meses
AF	3 años 3 meses
RU	4 años 10 meses
PM	3 años 9 meses

metabólicos mas alterados, sino aquellos cuya normalización metabólica ha sido mas lenta. Este comportamiento se observa mejor con las modificaciones del HOMA-IR en el niño AF que sugiere la inducción de resistencia a la insulina con la medicación.

El tratamiento produce un aumento de la demanda mitocondrial que se resuelve con su propia producción de sustratos. El aporte de acetil-L-carnitina y nicotinamida genera acetil-CoA y secundariamente NADH, que se traduce en una mayor actividad del ciclo TCA. Esta demanda es energética y secundariamente de síntesis de enzimas, lo que otorga un lapso para su adecuación. Esta diferencia es notable, porque una demanda de síntesis (como los derivados de troglitazona) puede llevar a la muerte porque la demanda de producción de enzimas supera la capacidad de síntesis y lleva a la apoptosis celular, especialmente en el hígado que en condiciones normales tiene una replicación celular del 5-7%.

PM y AF han presentado una brusca caída de su K_g con un mantenimiento elevado del HOMA-IR. Si se observa cuidadosamente la masa total de insulina en cada determinación, no solamente en estos niños sino en la mayo-

ría, se notará que a cada incremento del área de insulina bajo la curva de glucosa le sigue un aumento del HOMA-IR y una posterior caída de la insulina total. Como es conocido que el ácido nicotínico aumenta la resistencia a la insulina y se observa que luego de suspendido el tratamiento o disminuido en su dosis de ataque las insulinas totales mejoran, el interrogante es si una vez obtenida la remisión inicial no debería bajarse la dosis a la mitad. La pregunta es si esta disminución se debe aplicar luego de un tiempo fijo, por ej. 2 años, o si dependería de la respuesta del paciente. La realidad es que en los casos en que hubo que disminuir la medicación el resultado fue igualmente exitoso.

EVOLUCION DEL DESARROLLO Y DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CELULA BETA

Pacientes que suspendieron la medicación

PERCENTILOS

Paciente	PESO		TALLA		ANTICUERPOS	
	Inicio	Actual	Inicio	Actual	Inicio	Actual
BL	25-50	50	50	75	1	NEG
OM	75	90	97	+3 DS	1	NEG
HP	50	50-75	75	75	1	NEG
PVTS	25	25-50	25	50	3	1

Pacientes en tratamiento

PERCENTILOS

Paciente	PESO		TALLA		ANTICUERPOS	
	Inicio	Actual	Inicio	Actual	Inicio	Actual
AN	50	25-50	90	75	3	NEG
AF	75	90	97	97	1	NEG
RU	25	50	50	75	2	NEG
PM	75	90	75	90	1	NEG

Todos los niños han tenido un desarrollo normal, con crecimientos por arriba de sus percentilos. Esto se observó tanto en los que suspendieron la medicación como en los que continúan con el tratamiento. El niño AN que aparentemente disminuyó en su percentilo, se debió a que la primera determinación se realizó en un período de rápido crecimiento en relación a su edad.

Un comentario debe ser realizado sobre los anticuerpos. Se han negativizado en todos los pacientes, pero debe consignarse que no estaba presente en el diseño inicial del tratamiento sino que se presentó durante la evolución del mismo. Solamente un paciente persiste manteniendo un título mínimo de GADA. Un comentario se debe hacer sobre la evolución de este niño. Los demás niños negativizaron sus anticuerpos menos PVTs, que disminuyó los mismos de 3 a 1, como se observa en el cuadro. Es de notar que el niño viene aumentando sus valores de GADA desde que dejó el tratamiento y pese a que el título es bajo, la evolución sugiere que la medicación había detenido su desarrollo (se debe mirar la columna entre paréntesis, porque representa el valor neto una vez abstraído el inespecífico).

MUESTRAS	PACIENTE	GADA	PAA	IA-2A
	PHAN VAN THU S.	NEG	NEG	NEG
		POS 0,06 * (0,05)	NEG	NEG
MSTRAS RECIBIDAS 09-08		POS 0,224 (0,044)	NEG	POS 5,73 (5,69)
MSTRAS RECIBIDAS 20-01-09		POS 0,13 (0,049)	POS 5,254 (4,607)	NEG
MSTRAS RECIBIDAS 07-09		POS 0,75 (0,052)	NEG	NEG
MSTRAS RECIBIDAS AL 12-2010		POS 0,55 (0,03)	NEG	NEG
MSTRAS RECIBIDAS 8-11		POS 0,64 (0,075)	NEG	
MSTRAS RECIBIDAS AL 07-2013		POS 0,380 (0,086)	NEG	

Una explicación acerca de su negativización en nuestros pacientes podría surgir de los estudios de L-carnitina y acetil-L-carnitina como inductores de IGF1, que mejora la respuesta inmune e inhibe la apoptosis celular, modulando los mecanismos de autoagresión. Es por eso que se la emplea en los pacientes portadores del virus HIV.

Se ha sostenido que la presencia de 3 anticuerpos define que el portador va a evolucionar hacia la diabetes tipo 1 en una alta proporción y aunque su disminución no garantiza una evolución favorable es conocido que pacientes con otros tipos de anticuerpos, por ej. tiroideos, no evolucionan necesariamente hacia el hipotiroidismo. En el caso de diabetes tipo 1, otros elementos participan en su desarrollo, como ser las citoquinas, que no se encuentran objetivadas en el estudio de los anticuerpos. Los estudios metabólicos definen mejor el desarrollo de la diabetes tipo 1 ya que marcan la evolución de la enfermedad. Como fuere, este hallazgo refuerza los conceptos que promovieron el tratamiento con acetil-L-carnitina y nicotinamida en la prevención de la diabetes tipo 1.

En el cuadro a continuación se resumen los valores integrados de insulina en los niños tratados y en aquellos que suspendieron la medicación, desde los valores mínimos hasta los actuales.

Como se puede observar todos los niños incrementaron su área total de insulina. Una forma indirecta de evaluar la reserva insulínica y por lo

tanto de la masa disponible de las células beta. Este incremento va desde 1.7 veces a partir del valor mínimo anterior hasta 4.85 veces. Ningún niño en su evolución retrocedió en la secreción de insulina y no tenemos, pese a lo prolongado del estudio, ningún paciente que haya evolucionado hacia la diabetes clínica.

En definitiva, el tratamiento es seguido en su evolución por el incremento en la secreción de insulina mientras todos los tratamientos publicados han fracasado en el intento de mantener el nivel o detener la caída en la secreción de insulina ⁽⁸⁾. Este es el único estudio que mide el incremento de la secreción de insulina, no la velocidad de su desaparición, y que además carece de riesgos (por lo menos en la población estudiada).

AREA DE INSULINA (PRUEBA PTEVG)

Pacientes que suspendieron la medicación

	Menor valor	Suspensión	Evolución	Incremento
BL	(16/2/01) - 526 µU	(14/6/11) - 1258 µU	(21/12/12) - 1865 µU	S - 2.39 E - 3.55
OM	(12/1/09) - 430 µU	(12/6/12) - 1390 µU	(4/6/13) - 1327 µU	S - 3.23 E - 3.09
HP	(3/1/08) - 494 µU	(29/8/09) - 751 µU	(21/9/10) - 1429 µU (16/7/13) - HbA1c	S - 1.52 E - 2.89 --- 4.8
PVT S.	(22/8/08) - 474 µU	(3/1/10) - 1756 µU	(19/7/11) - 1699 µU (2/7/13) - HbA1c	S - 3.70 E - 3.58 --- 5.1

Pacientes en tratamiento

	Menor valor	Evolución	Incremento
AN	(21/12/10) - 627 µU	(8/1/13) - 1315 µU	2.10 veces
AF	(21/12/10) - 603 µU	(9/4/13) - 1023 µU	1.70 veces
RU	(12/5/09) - 156 µU	(7/5/13) - 756 µU	4.85 veces
PM	(29/3/11) - 244 µU	(23/7/13) - 768 µU	3.15 veces

La crítica que se le puede efectuar al trabajo es el número de niños incorporados. Hace falta recordar que los estudios con ciclosporina tenían 5 pacientes, que los estudios acerca del primer pico de secreción de insulina tenían 9 pacientes seguidos a lo largo de 10 años y que los estudios sobre el uso de insulina subcutánea tenían 7 pacientes ⁽⁸⁾. Estas investigaciones generaron luego estudios poblacionales que tuvieron muchos pacientes, pero

los estudios iniciales (pilotos) se generaron con escasos pacientes seguidos por un largo tiempo.

Estudios sobre acetil-L-carnitina y nicotinamida que explican los resultados hallados

La L-carnitina es el transportador de ácidos grasos desde el peroxisoma hasta la mitocondria para la producción de ATP a través de la b-oxidación. En hepatocitos aislados el aporte exógeno de L-carnitina no incrementa la b-oxidación aunque aumenta la disponibilidad de acil-carnitinas intramitocondriales ⁽⁹⁾, sugiriendo que con una disponibilidad normal de L-carnitina la b-oxidación se produce a su máxima velocidad. También se ha observado que acil-carnitinas de origen peroxisomal pasan a la mitocondria por difusión, sin la activación previa de carnitina palmitoil transferasa (CPT-1)⁽¹⁰⁾ aunque su significación metabólica no está cuantificada.

Por otra parte se demostró que el aporte permanente de dosis elevadas de L-carnitina disminuye el contenido graso de los tejidos y aumenta el contenido proteico. En un modelo experimental realizado en salmones, se demostró que la síntesis de aminoácidos a partir de los carbonos del ciclo tricarbóxico está incrementada, la degradación de aminoácidos ramificados está disminuida y el flujo metabólico de la piruvato carboxilasa (PC) está sumamente aumentado para poder aportar oxalacetato. En condiciones normales de ingesta el aumento de oxalacetato lleva a un incremento de citrato con activación de la acetil-CoA-carboxilasa (ACC) y secundariamente de malonil-CoA con inhibición de CPT-1, lo que inhibe el ingreso de ácidos grasos a la mitocondria. Como consecuencia de esta caída en el transporte de ácidos grasos existe una disminución de la b-oxidación, pero esto no ocurrió en este modelo experimental con aporte elevado de L-carnitina⁽¹¹⁾.

Lo que se observó en estos experimentos fue que el aporte de L-carnitina incrementó el transporte y la b-oxidación de los ácidos grasos con un aumento del 73% en la oxidación del palmitato, y un aumento del 81% en el flujo a través de la PC (por aumento de la síntesis de la enzima). El aumento del flujo de la PC con aumento del oxalacetato, produjo un aumento de la gluconeogénesis entre 120 y 210%. Hubo un aumento de los aminoácidos ramificados y de la síntesis de aminoácidos (entre 7 y 112% dependiendo de los aminoácidos considerados), sugiriendo una disminución de la actividad de la 2-oxoacido deshidrogenasa de aminoácidos ramificados (BCKAD). La disponibilidad de un "pool" de aminoácidos esenciales y no esenciales facilitó el aumento de la síntesis proteica (entre un 20 y 60%)⁽¹¹⁾. En las condiciones

descriptas no se observó el mecanismo de retro-inhibición por incremento de citrato y malonil-CoA, porque:

1. El “pool” de acetil-CoA no aumentó porque estaba en equilibrio con su consumo.
2. La relación ATP/ADP no se modificó porque el consumo de acetil-CoA fue hacia la síntesis de aminoácidos “de novo”.
3. No hubo incremento del citrato, que permaneció en equilibrio al igual que el acetil-CoA. Por lo tanto no hubo aumento de la actividad de ACC.
4. El consumo de grasa no se detuvo porque no hubo aumento del malonil-CoA.

La actividad metabólica fue similar al modelo de “knock out” de la isoenzima mitocondrial de la acetil-CoA-carboxilasa⁽¹²⁾. Por lo tanto se pudo postular que un aporte incrementado de L-carnitina produjo un mayor consumo de grasa en forma de energía y un mayor anabolismo a partir de piruvato. El pez tratado presentó mayor contenido proteico y menor masa grasa que el no tratado, con una cantidad significativamente mayor de aminoácidos ramificados en tejidos y sangre⁽¹¹⁾.

La acetil-L-carnitina como la L-carnitina incrementa la síntesis proteica y disminuye los depósitos de grasa al incrementar la β -oxidación de los ácidos grasos, aumentar la producción de ATP y reducir la resistencia a la leptina, como se observó en los animales viejos⁽¹³⁾. Posee similar comportamiento antiapoptótico que la L-carnitina, aunque sus efectos son menos intensos, disminuyendo la apoptosis en cultivos de “Jurkat cells” y de células neuronales⁽¹⁴⁾. El incremento en la producción de ATP fue rápida porque la acetil-L-carnitina entra directamente a la mitocondria donde participa del “pool” de acetil-CoA que se consume en el ciclo tricarboxílico⁽¹⁵⁾.

El aporte de nicotinamida sería otro mecanismo de inhibición de apoptosis, puesto que al aportar NAD⁺ inhibiría la activación de las caspasas 3 y 9 manteniendo la estabilidad de Vdac⁽¹⁶⁾. En el endotelio vascular la nicotinamida no solo mantuvo el potencial de la membrana mitocondrial previniendo la liberación de citocromo-c sino que previno la inducción de la caspasas 8, 1 y 3⁽¹⁷⁾.

La nicotinamida inhibe al gen de la poli-(ADP-ribosil)-polimerasa (PARP) que es un generador de necrosis celular⁽¹⁸⁾. Su activación se produce por el clivaje proteolítico de una proteína de bajo peso (cisteín-proteína-32-simil proteasa) llamada apoptain. La activación de PARP también se logra a través de

la proteólisis inducida por la interleukina-1 β -simil-enzima-convertidora. Dicha enzima ha sido descripta como iniciadora de apoptosis en la diabetes tipo 1⁽¹⁹⁾. El PARP reconstruye el ADN alterado y para esta función requiere de una disponibilidad normal de NAD⁺. Cuando el NAD⁺ disminuye o se agota el PARP se activa en forma irreversible consumiendo ATP hasta producir la necrosis celular. La nicotinamida basaría su respuesta anti-apoptótica y anti-necrótica no solamente por su capacidad de inhibir a la enzima PARP sino por su potencial para ser sustrato en la síntesis de NAD⁺.

En el caso de una respuesta celular de autoagresión con producción de óxido nítrico como ha sido demostrado en la diabetes autoinmune^(20,21) (pro-apoptótica al inducir ROS por incremento del óxido nítrico) el aporte de acetil-L-carnitina y nicotinamida podría actuar disminuyendo la respuesta apoptótica, favoreciendo y dando tiempo para la regeneración celular.

COMENTARIO FINAL

Cuando se inició el estudio la propuesta fue la inducción de “remisión” durante la prevención. Esto significaba que los cambios metabólicos objetivados remitieran, permitiendo que el paciente suspendiera el tratamiento. El hallazgo de la normalización del proceso autoinmune durante el tratamiento permite desarrollar una nueva propuesta. El tratamiento se suspenderá al lograr la *normalización de los parámetros metabólicos alterados y la negativización de los anticuerpos*, lo que supondría hablar de resolución de la diabetes tipo 1.

De estos resultados se desprende la conveniencia de efectuar estudios poblacionales (TRIAL) con este tratamiento ya que es el único carente de riesgos que en vez de estudiar como detener el deterioro de la célula beta o la velocidad de este deterioro, mide el incremento de la secreción de insulina y la recuperación de las células beta del páncreas.

REFERENCIAS

1. Cresto JC, Fabiano de Bruno L, Cao GF, Pastorale CF, Confalonieri N, Camberos MC, Basabe JC: The association of acetyl-L-carnitine and nicotinamide remit the experimental diabetes in mice by multiple low-dose streptozotocin. *Pancreas*. 33(4):403-411, 2006.

2. Shen W, Hao J, Tian C, Ren J, Yang L, Li X, Luo C, Cotman CW, Liu J: A combination of nutriment improves mitochondrial biogenesis and function in skeletal muscle of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Plos ONE* 3-e2328: 1-10, 2008.
3. Ferreira MR, Del C Camberos M, Selenscig D, Martucci LC, Chicco A, Lombardo YB, Cresto JC: Changes in hepatic lipogenic and oxidative enzymes and glucose homeostasis induced by an acetyl-L-carnitine and nicotinamide treatment in dyslipidaemic insulin resistant rats. *Clin Pharmacol Exp Physiol*. 40: 205-211, 2013.
4. Cutfield WS, Jefferies CA, Jackson WE, Robinson EM, Hofman PL: Evaluation of HOMA and QUICKI as measures of insulin sensitivity in pubertal children. *Pediatr. Diabetes* 4: 119-25, 2003.
5. Hollis S, Campbell F: What is meant by intention to treat analysis? Survey of published randomised controlled trials. *BMJ* 319: 670-74, 1999.
6. Knopf CF, Cresto JC, Dujovne IL, Ramos O, de Majo S: Oral glucose tolerance test in 100 normal children. *Acta Diab. Lat.* 14: 95-100, 1977.
7. Fernandez I, Camberos MC, Passicot G, Martucci LC, Cresto JC: Children at risk of diabetes type 1. Treatment with acetyl-L-carnitine plus nicotinamide – Case reports. *JEPM* 26(3-4): 347-355, 2013.
8. Lemmark A, Larsson HE: Immune therapy in type 1 diabetes mellitus. *Nature Review Endocrinol* 9: 92-103, 2013.
9. Bremer J: Carnitine – Metabolism and functions. *Am J Physiol* 63: 1420-1480, 1983.
10. Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR: Molecular enzymology of L-carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta* 1546: 21-43, 2001.
11. Bradley JH, Tremblay GC: Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed L-carnitine exhibit altered intermediary metabolism and reduced tissue lipid, but no change in growth rate. *J Nutr* 126: 1937-50, 1996.
12. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KAH, Wakil SJ: Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* 291: 2613-2616, 2001.
13. Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G: Acetyl-L-carnitine supplementation differently influences nutrient partitioning, serum leptin concentration and skeletal muscle mitochondrial respiration in young and old rats. *J Nutr* 132: 636-642, 2002.
14. Ishii T, Shimo Y, Matsuoka Y, Kinoshita K: Anti-apoptotic effect of acetyl-L-carnitine in primary cultured neurons. *Jpn J Pharmacol* 83: 119-124, 2000.
15. Tommaso A, Puccetti C, Di Cocco ME, Arduini A, Ricciolini R, Scalibastri M, Manetti C, Conti F: Entry of [(1,2-¹³C₂)acetyl]-L-carnitine in liver tricarboxylic acid cycle and lipogenesis. *Eur J Biochem* 263: 287-291, 1999.
16. Wosikowski K, Mattern K, Schemainda I, Llasman M, Rattel B, Loser R: WK175, a novel antitumor agent, decreases the intracellular nicotinamide adenine dinucleotide concentration and induces the apoptotic cascade in human leukemia cells. *Cancer Res* 62: 1057-1062, 2002.
17. Chong ZZ, Lin SH, Maiese K: Nicotinamide modulates mitochondrial membrane potential and cysteine protease activity during cerebral vascular endothelial cell injury. *J Vas Res* 39: 131-147, 2002.

18. Hyo Chol H, Solomon HS: Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13978-13982, 1999.
19. Mathis D, Vence L, Benoist C: Beta-cell death during progression to diabetes. *Nature* 414: 792-798, 2001.
20. Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E, Mori M: Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10845-10850, 2001.
21. Karabatas LM, Bruno LF de, Pastore CF, Cullen C, Basabe JC: Inhibition of nitric oxide generation: normalization of in vitro insulin secretion in mice with multiple low-dose streptozotocin and in mice injected with mononuclear splenocytes from diabetic syngeneic donors. *Metabolism* 45: 940-946, 1996.

PREVALENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN PACIENTES CON CÁNCER BUCAL. PRESENCIA DEL VIRUS EN SALIVA. RELACIÓN CON OTROS FACTORES DE RIESGO”

Criscuolo MI; Morelatto RA; Mosmann J; Cuffini C; López de Blanc SA
Cátedra de Estomatología B. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba

INTRODUCCIÓN

La infección por el virus del papiloma humano (VPH), en particular con los genotipos de alto riesgo, es actualmente la causa reconocida para la mayoría de los carcinomas de cuello de útero. En los últimos años, son numerosos los estudios sobre el rol de esta infección en el organismo y se han encontrado asociaciones con otros carcinomas como los ano-genitales y los de cabeza y cuello. Sin embargo, la relación del VPH en el proceso de carcinogénesis bucal, permanece como un tema controversial que requiere de mayor estudio⁽¹⁾. Se conoce que al igual que en la mucosa genital, las células basales del epitelio son las primeras en tomar contacto con el virus. Esto implica la existencia previa de una microabrasión sobre la superficie epitelial, que posibilita el ingreso del virus para luego replicarse en los estratos superiores⁽²⁾. Allí, la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo y su alta afinidad con p53 y Rb, generan una inestabilidad celular responsable de los cambios que conllevarían a la transformación maligna.⁽³⁾ Más allá de esto, la naturaleza multifactorial de los carcinomas bucales y la evidencia de que algunos casos puedan ocurrir sin la presencia de los factores de riesgo clásicos como el tabaco y el alcohol⁽⁴⁾, han originado diversas investigaciones orientadas a identificar otros factores llamados “emergentes”; como el traumatismo crónico⁽⁵⁾, el mal estado bucal, el consumo de bebidas calientes regionales como el mate y la infección con VPH de alto riesgo, entre otros⁽⁶⁾.

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de VPH en pacientes con diagnóstico de carcinoma a células escamosas de cavidad bucal y analizar su relación con otros factores de riesgo.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio caso –control. Se incluyeron pacientes que concurrieron al Servicio de Estomatología de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba. El proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud (CIEIS) de la Facultad de Odontología de la UNC.

Los criterios de inclusión fueron:

1. **Grupo Estudio (GE):** pacientes (n=72) de ambos sexos, con diagnóstico clínico e histopatológico de Carcinoma a células escamosas (CCEB) o carcinoma verrugoso (CV)
2. **Grupo control (GC):** pacientes (n=41) de ambos sexos, con lesiones no neoplásicas, no sugestivas de VPH como tumores hiperplásicos simples que requirieran de la cirugía para su tratamiento

Se excluyeron pacientes embarazadas.

Luego de la firma del consentimiento informado, se confeccionó una historia clínica, donde se consignaron los siguientes datos:

- **Consumo de tabaco:** se interrogó sobre el tipo y la cantidad de tabaco consumida durante su vida. Se consideraron fumadores a los que consumieron más de 100 mil cigarrillos (7).
- **Consumo de alcohol:** se interrogó sobre el tipo y la cantidad de bebidas alcohólicas consumidas durante su vida. Se excluyeron los bebedores ocasionales (8, 9).
- **Presencia de trauma:** se consideró de riesgo cuando se comprobó la existencia de trauma local crónico, dentario, protético o para-funcional en forma directa en relación a la lesión (6).

Recolección de las muestras: Se obtuvieron cuatro muestras de cada paciente

- a- saliva sin estimular, en tubo tipo eppendorf conservada en freezer (-80 °C).
- b- de la lesión mediante citobrush, se envió en tubo cónico estéril con 2-5 ml de solución buffer fosfato (PBS) con antibiótico y antimicótico conservado a 4°C. (CL)
- c- del contralateral sano a la lesión, mediante citobrush. (CS)
- d- biopsia de lesión: se realizó biopsia convencional con bisturí frío, al

momento del diagnóstico. La muestra fue fraccionada en dos partes: 1-para estudio anatomopatológico fijada con formol al 10% y 2-para PCR en fresco en tubo eppendorf conservada en freezer. Los estudios histopatológicos se realizaron en el laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología

Detección de VPH

Se realizó en el Instituto de Virología Dr. José María Vanella. Facultad de Ciencias Médicas. U.N.C.

En todas las muestras, para extracción de ADN (PCR), se utilizó el equipo comercial AccuPrep genomic DNA Extraction de Bioneer, con las condiciones que el fabricante describe en su protocolo. Se utilizaron los llamados primers genéricos MY09 y MY11 que permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 450 pares de bases, correspondientes a la región L1 del genoma viral, por ser esta una región altamente conservada. La tipificación se realizó mediante el análisis del producto amplificado por el estudio del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción enzimática (RFLP) con la utilización de las siguientes enzimas de restricción: Bam H1, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, Sau3 AI. El resultado da un patrón en banda característico⁽¹⁰⁾.

RESULTADOS

Se incorporaron al estudio un total de 113 pacientes, lo que corresponde a un total de 452 muestras analizadas.

El GE estuvo conformado por 72 pacientes, con un rango 39-85 años y una edad media de 64,5; el 54% eran varones.

El 87% (n=63) tuvieron diagnóstico de CCEB y 13% Carcinoma verrugoso (n=9). Treinta y cinco pacientes (49%) presentaron su carcinoma en lengua.

En el GC se incluyeron 41 pacientes con un rango 24-78 años y una edad media de 57,2; el 44 % eran varones. La localización más frecuente de la lesión fue en la mucosa yugal (34%)

Se detectó VPH en el 42% (n=30) de los pacientes del GE y en el 34%(n=14) del GC (Tabla 1). La presencia de VPH fue semejante en las lesiones de los pacientes de ambos géneros en el GE, mientras que en el GC fueron en su mayoría mujeres (57%). No se encontró asociación estadísticamente significativa entre cáncer y VPH, OR 1,38 IC (0.63-3.03) p=0.43.

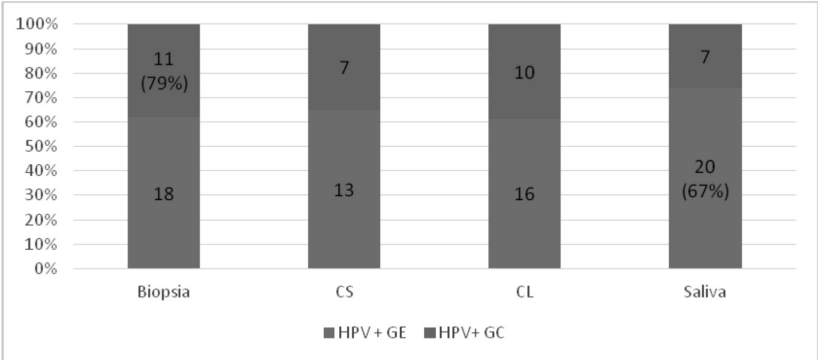
Tabla1: Distribución de resultados de PCR en ambos grupos

Grupo	VPH+ n(%)	VPH- n(%)
Grupo Estudio	30(42)	42(58)
Grupo Control	14(34)	27(66)
Total	44(39)	69(61)

En relación a las muestras obtenidas por paciente, el 80% del GE presentó más de una muestra positiva y predominando la detección de VPH en las muestras de saliva (67%), y las biopsias en segundo lugar.

En el GC, la presencia del VPH se demostró en el 57% de los pacientes y en más de una muestra, predominando la detección viral en las biopsias (78%) y en segundo lugar en los cepillados del contralateral sano (Gráfico 1).

Grafico1: GE y GC VPH positivos. Presencia de VPH según la muestra (n)



De acuerdo a la prevalencia de infección por VPH según la localización se observó que de los 30 pacientes positivos del GE 18 (60%) se ubicaron en la lengua; mientras que en el GC solo el 29% (Tabla 2).

Tabla 2: Distribución según localización

Localización	VPH+ del GE	VPH- del GE	VPH+ del GC	VPH- del GC
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
Lengua	18 (60)	17 (40)	4 (29)	4 (29)
Reborde/encia	4 (13)	8 (19)	0	6 (43)
Piso de boca	2 (7)	6 (14)	0	0
Mucosayugal	1 (3)	7 (17)	7 (50)	7 (50)
Paladar	3 (10)	2 (5)	3 (21)	2 (14)
Semimucosa labial	2 (7)	1 (2)	0	1 (7)
Fondo de surco	0	1 (2)	0	0
Mucosa labial	0	0	0	5 (36)
Otro	0		0	1 (7)
Total	30	42	14	26

Los genotipos de VPH detectados fueron 16, 6, 11, 31, 33, 45, 52, 53 y 69, .siendo los más frecuentes 16, 6 y 11. En el GE el 40%⁽¹²⁾ de los pacientes presentaron genotipos de alto riesgo y en el GC solo 2 (14%), siendo el 57% de los pacientes positivos de este grupo de bajo riesgo.

En relación a factores de riesgo convencionales los pacientes del GE relataron consumo de tabaco y de alcohol en un 58% y 49% respectivamente. No se hallaron diferencias entre los grupos VPH positivo y negativo, y en todos los casos, no se encontraron como factores de riesgo independientes, sino asociados, principalmente con trauma dentario o protético (Tabla 3).

Tabla 3: Factores de riesgo

Factores	GE	GC	Total
Ninguno	0	6	6
I	0	1	1
Ir	15	10	25
V	5	0	5
A	0	1	1
IA	7	1	8
IATr	11	4	15
IAV	8	1	9
ITr	6	4	10
ATrV	2	1	3

Factores	GE	GC	Total
TATrV	7	4	11
ATr	2	0	2
TTrV	2	3	5
TrV	7	5	12
AV	0	1	1
Total	22	13	35

T= tabaco, A= alcohol, Tr= trauma, V=virus.

Al analizar los factores de riesgo emergentes del GE, 5 pacientes (17%) presentaron VPH como único factor asociado y de éstos 3 (60%) se localizaron en lengua. Del grupo control todos los pacientes presentaron factores de riesgo asociados, siendo el trauma el más frecuente (76%), seguido por el tabaco 41% y por el alcohol 29%.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio, la detección del VPH en CCEB, resultó positivo en un 42%, lo cual es un porcentaje similar al descrito en trabajos realizados en nuestro medio^(11,12) y resultó superior al porcentaje encontrado en el grupo control, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. En relación estudios de la bibliografía, los porcentajes son más variados, Syrjanen (2000) describe un 31,3% y D Souza- Guillison (2007) un 64% de VPH positivos en carcinomas bucales.

El alto porcentaje de positividad del GE, hallado en lengua (60%), estaría asociado a la exposición de esta zona al trauma, lo cual facilitaría la entrada del virus al epitelio^(13,14).

Si bien existe un amplio grupo de genotipos de VPH identificados, los relacionados al CCEB son los de alto riesgo, dentro de los cuales el 16 es el más descrito en la bibliografía⁽¹⁵⁾. Nuestros resultados son similares a los descritos por otros autores, mostrando un predominio de genotipos de alto riesgo en el GE, y donde el genotipo 16 representa el 50% de los mismos.

En relación a factores de riesgo para el CCEB, el consumo de tabaco y alcohol en ambos grupos siempre se hallaron asociados a otros factores. Sin embargo, en el GE pudimos observar que 15 pacientes presentaron trauma como único factor y siete asociados a VPH. En cinco pacientes la infección con VPH fue el único factor encontrado (7%)

CONCLUSIONES

Algunos carcinomas bucales podrían relacionarse a factores emergentes, como el VPH, y el genotipo 16 es el más frecuentemente asociado.

La localización en lengua, como sitio de la cavidad bucal altamente expuesto al trauma dentario o protético, puede asociarse al ingreso del virus al epitelio. Resultaría interesante seguir estudiando los factores traumáticos y la infección por VPH en relación al carcinoma bucal.

REFERENCIAS

1. Syrjanen, S. Human Papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of Clinical Virology* 32S (2005) S59-S66
2. Pullos, AN; Castilho, RM; Squarize CH. HPV Infection of the Head and Neck Region and Its Stem Cells. *Journal of Dental Research* (2015) 1-12.
3. Syrjanen S; Lodi G; Bulzingslowen I; Aliko A; Arduino P; Campisis G; Challacombe S; Ficarra G; Flaitz C; Zhou HM; Maeda H; Miller C; Jontell M. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Diseases* (2011) 17 (Suppl I) 58-72
4. Dahlstrom KR; Little JA; Zafereo ME; Lung M; Wei Q; Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of head and neck in never-smoker - never-drinkers: a descriptive epidemiologic study *Head & Neck-DOI 10.1002/hed* (2008): 75-84.
5. Piemonte, ED; Lazos JP; Brunotto M. Relationship between trauma of the oral mucosa, oral potentially malignant disorders and oral cancer *J of Oral Pathology & Medicine* (2010) 39: 513-17.
6. Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer-an appraisal of controversies. *Br Dent J* (2009); 207: 471-5
7. Biondi K; Belloni S; Velasco M; Robledo G; Gallardo A; Femopase F; et al. Correlation between oral precancer and cancer and tobacco. *J Dent Res* (1998); 77:5.
8. Pentenero M, Brocoletti R, Carbone M; Corotto D; Gandolfo S. The prevalence of oral mucosal lesions in adults from the Turin area. *Oral Diseases* (2008) 14, 356-366.
9. Caciua R; Belardinelli P; Blanc ML, López de Blanc SA; Alcohol y salud!! Alcohol y salud? Revisión bibliográfica. *Claves de Odontología* (2015); 74: 41-46.
10. Villers and col. Techniques of PCR. *Virology* (2004): 17-27.
11. Venezuela, RF; Talavera, A; Frutos, MC; Kiguen, AX; Monetty, MS; Sollazo, M; Panico, R; Ferreyra de Prato, R; Cuffini, C. Human Papillomavirus (HPV) in Oral Cavity Lesions: Comparison with Other Cancer Risk Factors. *Journal of Microbiology Research* (2013), 8 (8): 228-233.
12. Furrer VE; Benitez MB; Furnes M; Lanfranchi HE; Modesti NM. Biopsy vs. Superficial scraping: detection of human papillomavirus 6, 11, 16 and 18 in potentially malignant and malignant oral lesions. *J Oral Pathol Immunol* (2006) 35: 338-44.

13. D'Souza G; Kreimer; Viscidi R; Pawlita M; Fakhry C; Koch WM; Westra WH; Gillison ML. Case-Control Study of Human papillomavirus and Oropharyngeal cáncer. The New England Journal of Medicine (2007); 356: 1944-56.
14. Shaw R; Robinson M. The increasing clinical relevance of human papillomavirus type 16 (HPV-16) infection in oropharyngeal cáncer. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 49 (2011) 423-429.
15. Chuang AY; Chuang TC; Chang S; Zhou S; Begum S; Westra WH; Ha PK; Koch WM; Califano JA. Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses in an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncology (2008) doi:10.1016: 1-5

RESÚMEN

La relación del VPH en el proceso de carcinogénesis bucal, aún es un tema controversial. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de VPH en pacientes con diagnóstico de carcinoma a células escamosas de cavidad bucal y analizar su relación con otros factores de riesgo. Se realizó un estudio caso-control, donde se incluyeron pacientes que concurren al Servicio de Estomatología de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba. El Grupo Estudio (GE) (n=72) pacientes de ambos sexos, con diagnóstico de Carcinoma a células escamosas (CCEB) o carcinoma verrugoso (CV) y el Grupo control (GC): (n=41) pacientes de ambos sexos, con lesiones no neoplásicas, no sugestivas de VPH. Se obtuvieron cuatro muestras de cada paciente: a-saliva sin estimular, b-de la lesión mediante citobrush, c- del contralateral sano a la lesión y d- biopsia de lesión. En todas las muestras, para extracción de ADN (PCR), se utilizó el equipo comercial AccuPrep genomic DNA Extraction de Bioneer, y se utilizaron los llamados primers genéricos MY09 y MY11. Resultados: El GE (n= 72), rango 39-85 años, edad media de 64,5; el 54% eran varones y 49% presentaron su carcinoma en lengua. El GC (n=41) rango de 24-78 años y edad media de 57,2, el 34% en mucosa yugal. Se detectó VPH en el 42% (n=30) de los pacientes del GE y en el 34% (n=14) del GC. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre cáncer y VPH, OR 1,38 IC (0.63-3.03) p=0.43. En el GE el 40%⁽¹²⁾ de los pacientes presentaron genotipos de alto riesgo y en el GC solo 2 (14%). los pacientes del GE relataron consumo de tabaco y de alcohol en un 58% y 49% respectivamente. No se hallaron diferencias entre los grupos VPH positivo y negativo, y en todos los casos, no se encontraron como factores de riesgo independientes, sino asociados, principalmente con trauma dentario o protético. Del grupo

control todos los pacientes presentaron factores de riesgo asociados, siendo el trauma el más frecuente (76%), seguido por el tabaco 41% y por el alcohol 29%. Conclusiones: Algunos carcinomas bucales podrían relacionarse a factores emergentes, como el VPH, y el genotipo 16 es el más frecuentemente asociado. La localización en lengua, como sitio de la cavidad bucal altamente expuesto al trauma dentario o protético, puede asociarse al ingreso del virus al epitelio y resultaría interesante continuar estudiando los factores traumáticos y la infección por VPH en relación al carcinoma bucal.

ABSTRACT

The aim of study was to determine the presence of HPV in patients with oral squamous cell carcinoma and analyze its relationship with other risk factors. A case-control study involving patients attending the Estomatology Service, Faculty Dentistry, National University of Córdoba. The Study Group (SG) was (n=72) patients, both sexes with diagnosis of squamous cell carcinoma (SCC) or verrucous carcinoma (VC). Control group (CG): (n=41) patients, both sexes with non-neoplastic lesions not suggestive of HPV. Four samples were taken: a- unstimulated saliva, b- lesion with cytobrush, c- respective contralateral healthy site, and d- biopsy. DNA was extracted (PCR) using the Bioneer's AccuPrep genomic DNA Extraction kit. Generic primers MY09 -MY11 were used. Results: SG (n= 72), 54% males, age range 39-85 years, mean age 64.5; 49% had tongue carcinoma. CG (n=41), age range of 24-78 years, mean age 57.2; 34% of them had buccal mucosa lesions. HPV was detected in 42% (n=30) of SG and 34% (n=14) of CG. No statistically significant association was observed between cancer and HPV, OR 1.38 CI (0.63-3.03) =0.43. In SG, 40% (12) of patients had high-risk genotypes and in CG, only 2 (14%). SG patients indicated tobacco and alcohol consumption (58% and 49%, respectively). No differences were observed between HPV negative and positive groups; they were associated, mainly with dental or prosthesis trauma. All the patients of control group exhibited associated risk factors, with trauma being the most frequent (76%), followed by tobacco (41%). Conclusions: Some oral carcinomas might be related to emerging factors, such as HPV, with genotype 16 being most frequently. The location in the tongue, as the oral cavity site highly exposed to trauma can be associated with the entry of the virus to the epithelium. It would be interesting to continue studying the trauma and HPV infection in relation to oral carcinoma.

ESTUDIO DE LAS INFECCIONES CLAMIDIALES ATÍPICAS DEL TRACTO GENITAL ASOCIADAS A LA INFERTILIDAD.

Biol. Marina Monetti; Dra. Gabriela Paglini; Bioq. Patricia Estofan; Bioq. Rosa Molina; Dra. Cecilia Cuffini.
Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella" FCM-UNC; CIGOR y LAR.

En el género *Chlamydia*, que incluye especies: *C.trachomatis*, *C.muridarum*, *C.suis*, *C.psittaci*, *C.pecorum*, *C.pneumoniae*, *C.abortus*, *C.felis* y *C.caviae* ⁽¹⁾. *C.trachomatis* es la segunda causa mundial de infección de transmisión sexual (ITS) en humanos ⁽²⁾ que ha sido identificada como un factor significativo en el desarrollo de infertilidad^(3;4) Y puede estar asociada con las bacterias *Mycoplasma hominis* (*M.hominis*), *Ureaplasma urealyticum* (*U.urealyticum*) ⁽⁵⁾.

Las especies *C.psittaci* y *C.pneumoniae* producen enfermedades respiratorias, la primera es el agente patógeno de la ornitosis o psitacosis, afecta a las aves y puede transmitirse a humanos ⁽⁶⁾. *C.pneumoniae* provoca una inflamación aguda en el sistema respiratorio que puede llegar a ser persistente ⁽⁷⁾. Las infecciones por *C.pecorum* en ovejas, vacas, caballos, cerdos y koalas se asocian a neumonía, conjuntivitis, poliartritis, aborto e infertilidad ⁽⁸⁾. Algunos estudios informaron que estas especies clamidiales pueden infectar atípicamente el tracto genital humano^(9,10,11).

El principal objetivo de este trabajo fue *aportar conocimientos sobre la presencia de las especies clamidiales atípicamente detectadas en el tracto genital de pacientes asintomáticos infértiles de la ciudad de Córdoba, Argentina. Determinando la prevalencia de C.trachomatis y sus genotipos para compararla estadísticamente con la prevalencia de las clamidias atípicas: C.psittaci, C.pecorum y C.pneumoniae. Además se estudiaron microorganismos relacionados con infertilidad: U.urealyticum y M.hominis.*

MATERIALES Y MÉTODOS

La población de estudio comprendió 660 pacientes adultos de 21 a 55 años de edad (439 mujeres y 221 hombres) que consultaron por infertilidad

durante el año 2012 a dos centros privados de reproducción (LAR y CIGOR) en la ciudad de Córdoba, Argentina. Las muestras urogenitales consistieron en 437 hisopados cervicales (HC), 5 hisopados uretrales (HU), 148 tubos con hisopado uretral y semen del mismo paciente (HUS) y 70 muestras de semen (S); obtenidas por los profesionales de los centros y enviadas al Instituto de Virología, FCM-UNC. El proyecto fue aprobado por el comité de ética C.E.I.E.S. Oulton-Romagosa, Córdoba.

La extracción de DNA se realizó a partir de 200 µl de muestra usando Accuprep Genomic DNA (BIONEER, Alameda, CA, USA). La amplificación del gen *ompA* *C.trachomatis* (1045pb) se realizó con cebadores SeroA1/SeroA2 en la PCR y Sero A2/PCTM3 en la Nested PCR. Para detectar el plásmido críptico (201pb) de esta especie, se utilizó primers CTP1/CTP2⁽¹²⁾. Los productos obtenidos por PCR- *ompA* genérica (576–597 pb) fueron analizados para detectar todas las especies (*Chlamydia spp*) usando cebadores CHOMP 191/CHOMP 371⁽¹³⁾. Las muestras positivas fueron secuenciadas para identificar los genotipos, mediante el análisis por Blast usando el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis,⁽¹⁴⁾ y alineadas con otras secuencias de clamidias disponibles en el GenBank para el análisis filogenético.

A partir del producto de la PCR genérica, se realizó una Nested-PCR del gen *ompA* para la detección de *C.psittaci* (389-404 pb) con cebadores CHOMP 336/218 y CHOMP 336/204 para *C.pecorum* (426-441 pb) según Sachse y Hotzel, 2003⁽¹³⁾.

A partir del DNA extraído, el gen *rpoB* de *C.pneumoniae* fue amplificado con dos Hemi Nested-PCR utilizando los cebadores HL1/N2 y N1/HR1 obteniendo productos de 273 pb y 249 pb⁽¹⁵⁾.

Se seleccionaron 62 muestras positivas por PCR genérica para evaluar y determinar la carga bacteriana por Real Time PCR (qPCR), usando un termociclador ABI Prism7000 (Applied Biosystems), según protocolo desarrollado por Everett et al., 1999⁽¹⁶⁾. El valor del cycle threshold (Ct) fue calculado automáticamente.

La presencia de *M.hominis* y *U.urealyticum* se detectó con el equipo comercial Mycofast Evolution II.

Las variables continuas fueron analizadas por test de Student. Las variables categóricas mediante el test X2. La significancia estadística se estableció a un $p < 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico STATISTIC versión 6.0 (2300 EAST 14 th street, Tulsa, OK, USA, 2005) para Windows de Statsoft.

RESULTADOS

La presencia de *Chlamydia spp* fue del 17,0 % (112/660), identificando las especies *C.trachomatis* (7,3 %), *C.psittaci* (1,1 %), *C.pecorum* (0,2 %) y *C.pneumoniae* (9,2 %). El análisis de las secuencias confirma los resultados obtenidos por PCR y demuestra que las mismas presentan alta homología con otras cepas que circulan en nuestra región. Los genotipos de *C.trachomatis* identificados por secuenciación de los productos de PCR del gen *ompA* fueron D 12,5% (1/8), E 12,5% (1/8), G 25% (2/8), L1 50% (4/8). El genotipo L1 fue detectado en 1 HC, 1 HU y 2 HUS; los genotipos E y G en HC, mientras que el genotipo D en 1 HUS (Figura 1). El análisis por BLAST realizado a partir de productos de clamidias atípicas (*C.psittaci*, *C.pecorum* y *C.pneumoniae*) reveló que la secuencia del gen *ompA* de la muestra *C.psittaci* CA043, presentó alta homología con las secuencias de genotipos aviares A, B, E y E/B y con secuencias humanas de Argentina (Figura 2); la secuencia *C.psittaci* CA042; incluida en el mismo grupo, presentó menos homología con dichos genotipos. La secuencia *C.psittaci* CA359 mostró más homología con una cepa *C.psittaci* de mamíferos (WC). El árbol filogenético también exhibe que *C.pecorum* CA043 presentó alta similitud con una secuencia de ave encontrada en Argentina *C.pecorum* ARG AMB P7 (Figura 2). Por otra parte, nuestras secuencias de *C.pneumoniae* (gen *rpoB*) exhiben alta homología (>98%) con otras secuencias de *C. pneumoniae* detectadas en animales de Argentina (ARG PK3, ARG PK14) (Figura 3).

Por qPCR se logró obtener la carga bacteriana en el 10 % (6/62) de las muestras positivas por PCR genérica; previamente positivas para *C.pneumoniae* y el 67% además para *C.trachomatis*. Una de éstas coinfectada con *C.psittaci*.

La prevalencia de *M.hominis* y *U.urealyticum* fue determinada en 236 pacientes, obteniendo un 25,9% (61/236) y 30,9% (73/236) respectivamente, sin diferencias significativas ($p=0,261$). En mujeres el porcentaje de infección con *M.hominis*, *U.urealyticum* fue de 39,7% (31/78), 47,4% (37/78), en varones de 18,9% (30/158), 22,8% (36/158) respectivamente, siendo significativamente más alta en mujeres ($p<0,05$). *M.hominis* se detectó principalmente en muestras: HC 38,9% (30/77) e HU 33,3% (1/3); *U.urealyticum* se encontró con más frecuencia en S 53,9% (7/13) y en HC 46,8% (36/77). En este grupo de pacientes la presencia de *C.trachomatis*, *C.pneumoniae*, *C.psittaci* y *C.pecorum* fue menor ($p<0,05$), constituyendo un 5,1 % (12/236), 7,6 % (18/236), 1,2 % (3/236) y 0,4 % (1/236) respectivamente.

El mayor porcentaje de co-infecciones se presentó con *M.hominis* y *U.urealyticum* (16,1%), mientras que las coinfecciones con *C.trachomatis* sólo fueron detectadas en 1 paciente (*U.urealyticum* y *C.trachomatis*). En el 1,7 % (4/236) se detectó coinfección de *M.hominis* y *C.pneumoniae*; en el 2,9% (7/236) coinfección de *U.urealyticum* y *C.pneumoniae*; y una triple coinfección de éstas en dos muestras.

El análisis de la interacción de las cepas de clamidias con el citoesqueleto de la célula tuvo una limitación importante en la dificultad que representó el aislamiento, adaptación y amplificación en cultivo celular de las cepas detectadas en estos pacientes; aunque los resultados obtenidos con las cepas patrones fueron comparables con los publicados previamente sobre *C.trachomatis* por otros autores.

FALTA

Fig. 1. Análisis filogenético de la región *omp A* del genoma de *C.trachomatis* (900 pb) construido por Método Neighbor-joining. Las cepas pertenecientes a este estudio empiezan con CA. Los bootstrap (≥ 500) están indicados en los nodos internos (1000 pseudoreplicas). Entre paréntesis se indica el código de acceso al GenBank.

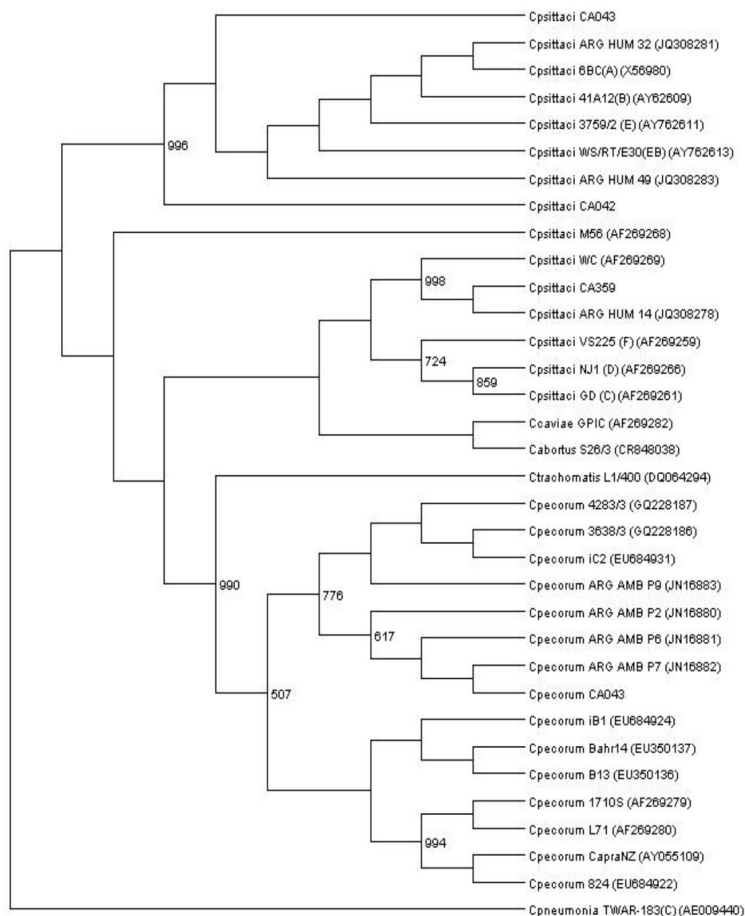


Fig. 2. Análisis filogenético de la región *omp A* del genoma de *C.psittaci* (290 pb) y *C.pecorum* (290pb) construido por Método Neighbor-joining. Las cepas pertenecientes a este estudio empiezan con CA. Los bootstrap (≥ 500) están indicados en los nodos internos (1000 pseudoreplicas). Entre paréntesis se indica el código de acceso al GenBank.

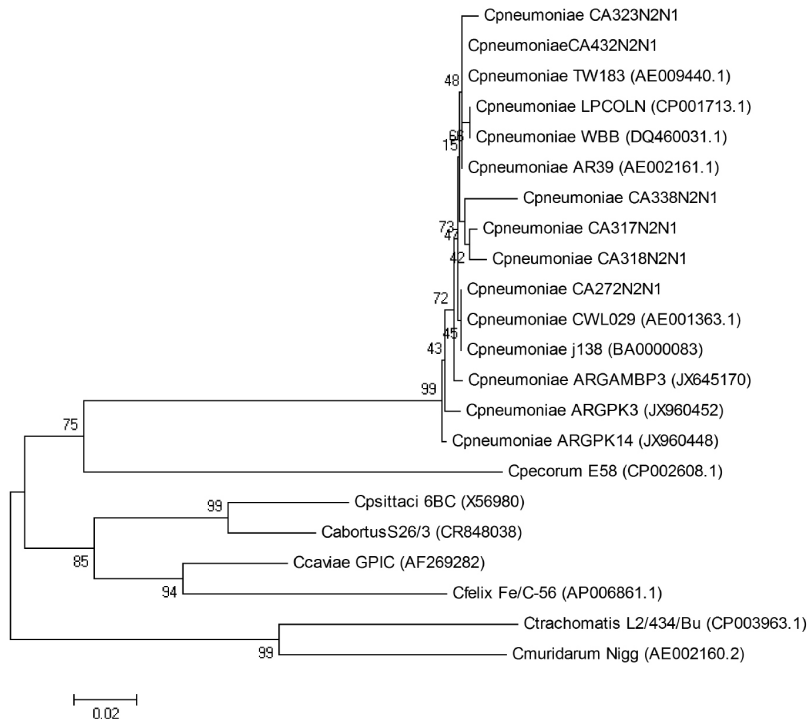


Figura 3. Análisis filogenético de la región *rpoB* del genoma de *C.pneumoniae* (300 pb) construido por Método Neighbor-joining. Las cepas pertenecientes a este estudio comienzan con CA. Los bootstrap (≥ 500) están indicados en los nodos internos (1000 pseudoreplicas). Entre paréntesis se indica el código de acceso al GenBank.

DISCUSIÓN

En el presente estudio encontramos varios resultados interesantes, en primer lugar obtuvimos una prevalencia de *C.trachomatis* del 7,5% en mujeres y 6,8% en hombre, resultados similares en mujeres infértiles fueron obtenidos en Polonia (8,3%). Los genotipos de *C.trachomatis* detectados (8/660) fueron: L1 (4/8), G (2/8), D (1/8) y E (1/8). Sorprendentemente, detectamos una alta proporción (4/8) genotipos L1 en pacientes sin síntomas de LGV⁽¹⁷⁾,

resultados similares a De Haro-Cruz en México⁽¹⁸⁾, quien detectó genotipo de LGV en pacientes infértiles.

En nuestro estudio la detección de *Chlamydia spp* en pacientes infértiles asintomáticos fue de 17%. En un trabajo similar pero realizado en una población de mujeres sintomáticas Egipcias, detectaron *Chlamydia spp* en el 70%. En esta región los autores sugieren que las prácticas y costumbres de colocar estiércol en las paredes de las chozas, serían una posible ruta de transmisión. También detectaron *C.trachomatis*, *C.abortus* y *C.psittaci* por técnica de RFLP en 15,2%, 35,7% y 50% respectivamente⁽¹⁹⁾ Nosotros detectamos una menor prevalencia de *C.psittaci* en pacientes infértiles asintomáticos. *C.pecorum* ha sido asociada a rumiantes⁽⁸⁾, recientemente fue detectado en aves en Alemania⁽²⁰⁾, y en nuestro trabajo la detectamos en un paciente infértil, sin embargo hasta el momento no ha sido reportada en humanos. Aunque *C.pneumoniae* fue la especie clamidial detectada en mayor porcentaje (9,8 %), varios trabajos confirman el tropismo de este patógeno por diversos tejidos y su asociación a una gran variedad de enfermedades crónicas, incluso Babbonian et al la detectaron en 44% de tejidos de placenta humana⁽¹¹⁾. Dilucidar el posible rol patogénico de esta clamidia en las enfermedades crónicas persistentes es uno de los principales desafíos en la actualidad.

La determinación de la carga bacteriana brindaría datos muy interesantes, al relacionarla con parámetros espermáticos. En pocas muestras pudimos obtener datos y observamos una baja carga bacteriana (<10 genomas/ μ L), sin embargo no disponemos de la información suficiente para establecer conclusiones certeras. Suponemos que descongelar las muestras (PCR positivas), degradaron el ADN templado resultando negativas por qPCR, otros autores también discuten resultados similares⁽²¹⁾.

El árbol filogenético obtenido a partir del análisis de las secuencias del gen *ompA* de *C.trachomatis* revela tres subdivisiones, pero no coinciden con los patrones de presentación clínica (infecciones urogenitales, trachoma y LGV) y tropismo de tejidos. Los mismos resultados fueron analizados y discutidos por Brunelle y Sensabaugh, y Lutter⁽¹⁷⁾. Por otra parte, el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de *C.pecorum* y *C.psittaci* del gen *ompA* y de *C.pneumoniae* del gen *rpoB*, confirman los resultados obtenidos por Nested-PCR. El árbol filogenético del gen *ompA* agrupa nuestras secuencias de *C.psittaci* con los genotipos WC, A, B, E y E/B. El genotipo WC1 aislado de mamíferos, mientras que los restantes de aves. Nuestra secuencia de *C.pecorum* CA043 muestra elevada homología con secuencias detectadas en aves de Argentina (ARG AMB P7 y ARG AMB P6)⁽²²⁾. En el

análisis filogenético de nuestras secuencias del gen *rpoB* de *C.pneumoniae*, se observa que presentan alta similitud con secuencias de otros lugares del mundo y de animales de Córdoba, Argentina (ARGPK y ARGAMB), reafirmando la circulación de estas cepas en nuestra región.

Además en el presente estudio un alto porcentaje de *M.hominis* y *U.urealyticum* en el 36% (236/660) fue detectado en nuestros pacientes. Las coinfecciones de estas especies con clamidias no mostraron gran significancia.

Nuestros hallazgos indican principalmente que *C.trachomatis* no sería la única especie clamidial detectada en el tracto genital de pacientes con infertilidad; teniendo en cuenta los resultados presentados en el presente trabajo, otras especies clamidiales, capaces de producir infecciones graves principalmente en tracto respiratorio estarían circulando en esta población de pacientes infértiles. No obstante son necesarias más investigaciones para determinar su posible rol zoonótico y patogénico en tracto genitourinario de pacientes infértiles.

Palabras clave: Infertilidad, *Chlamydia*, análisis filogenético

REFERENCIAS

1. Longbotton y Coulter, Journal Comparative Pathology, 2003.
2. Bush, M., et al, Journal Veterinary Medical, 2000.
3. Pérez Monrás y Almanza Martínez, (Ed.). (2001). Clamidias. Microbiología y Parasitología Médica. TI. La Habana.
4. Cunningham y Kenneth, Biology of Reproduction, 2008.
5. Michou et al, The journal of obstetrics and gynaecology research, 2014
6. Voigt et al, PLoS ONE, 2012
7. Gislason et al, BMC Pulmonary Medicine, 2010
8. Mojica et al, Journal of Bacteriology, 2011
9. Psarrakos, Molecular and Cell Probes, 2011
10. Bush et al, Journal Veterinary Medical, 2000.
11. Baboonian et al, Cardiovascular Research, 2003
12. Lan et al, Journal Clin Microbiol, 1995
13. Sachse y Hotzel, Methods in Molecular Biology, 2003
14. Tamura et al, Molecular Biology and Evolution, 2007
15. Mass et al, Journal of American College of Cardiology, 1998
16. Everett et al., Journal of Clinical Microbiology, 1999.
17. Monetti et al, International Journal of Virology and Molecular Biology, 2012
18. De Haro-Cruz et al, Enferm Infecc Microbiol Clin 2011.

19. Osman et al, Microbiol Drug Resistance, 2012
20. Sachse et al, Veterinary Microbiology, 2012
21. Jacobson et al, Journal of Veterinary Diagnostic, 2004
22. Frutos et al, Diagnostic Microbiology Infectious Diseases, 2012

ABSTRACT

The main objective of this study was to detect the presence of atypical species of *Chlamydia* (C.) in the genital tract of asymptomatic infertile patients from the city of Córdoba, Argentina. Six hundred sixty samples (semen, cervical and urethral swabs) were analyzed using molecular biology techniques to study the presence of *C. trachomatis*, like principal pathogen in patients with infertility; and mainly to assess infection with other chlamydial species little studied and known in these patients: *C. psittaci*, *C. pecorum* and *C. pneumoniae*. The PCR products obtained (*ompA* targeting and *rpoB* genes) were sequenced and aligned with other chlamydial sequences available in GenBank for phylogenetic analysis. *Chlamydia* spp detection by PCR of *ompA* gene was 17.0% (112/660), identifying *C. trachomatis* (7.3%), *C. psittaci* (1.1%), *C. pecorum* species (0.2%) and *C. pneumoniae* was detected by amplification of the *rpoB* gene in 9.2% (61/660) of samples. The sequence analysis confirms the results obtained by PCR and demonstrated that they have high homology with other strains circulating in our region. Our results indicate the presence of other chlamydial species; atypical in genital tract from patients with infertility, which may have a pathogenic role that has not yet been demonstrated.

Keywords: Infertility, Chlamydia, Phylogeny

ESTUDIO DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS DE USO CLÍNICO DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DE *ASPERGILLUS TERREUS*.

Investigador principal: Fernández, Mariana Soledad
Colaborador: Mangiaterra, Magdalena Leonilda
Instituto de Medicina Regional-Universidad Nacional del Nordeste-
Departamento de Micología

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, las infecciones fúngicas producidas por especies de *Aspergillus* se han convertido en una de las principales causas de morbimortalidad entre pacientes inmunocomprometidos^(1,2). *Aspergillus fumigatus* es la especie aislada con mayor frecuencia, aunque se ha observado un aumento en la incidencia de otras especies, entre ellas *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*^(1,3).

A. terreus es considerado un hongo oportunista emergente que puede producir desde infecciones fúngicas superficiales hasta infecciones invasivas graves⁽³⁻⁶⁾. Como el aislamiento del hongo no siempre es posible, muchas veces estas infecciones son tratadas empíricamente y, en la mayoría de los casos, con anfotericina B (AMB) por ser una droga de amplio espectro ampliamente utilizada en infecciones fúngicas graves. Pero la mayoría de los aislamientos de *A. terreus* son resistentes in vivo e in vitro a esta droga^(7,8).

El uso de nuevas drogas para el tratamiento de la aspergilosis invasora optimizó la respuesta clínica obtenida frente a las infecciones producidas por *A. terreus*. Entre estas drogas, el voriconazol (VRC) demostró ser la más efectiva, in vivo e in vitro, frente a esta especie^(9,10), pero debemos considerar que la adquisición de resistencia a los azoles ya ha sido documentada entre especies de este género. En algunos países ya se han informado aislamientos clínicos de *A. terreus* que muestran una Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) elevada frente a el itraconazol (ITC) y el VRC^(7,11,12).

El objetivo de este estudio fue determinar el perfil de sensibilidad de aislados clínicos y ambientales de *A. terreus* frente a la AMB, el ITC, el VRC y la terbinafina (TRB).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron aislados ambientales y clínicos de *A. terreus* complex, que se encontraban depositados en la Colección de Cultivos del Área de Micología del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste, los cuales fueron identificados por su macro y micromorfología y por métodos moleculares (secuenciación de un segmento del gen Calmodulina (calM)). Las secuencias de calM fueron almacenadas en el European Nucleotide Archive. Los números de acceso son LN734824-LN734874, disponibles en <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LN734824-LN734874>.

La CIM y la interpretación de los resultados se realizó según el método de referencia, M38-A2 del CLSI⁽¹³⁾. Se ensayó la actividad in vitro del VRC (Pfizer), el ITC (Sigma-Aldrich), la TRB (Sigma-Aldrich) y la AMB (Sigma-Aldrich). El rango final de concentración de todas las drogas fue de 0,0313 a 16 µg/mL. Como cepas de control de calidad se incluyeron *Candida krusei* ATCC 6258 y *A. flavus* ATCC 204304. Se consideró como punto final para la AMB y los triazoles la concentración de antifúngico que produjo una inhibición completa (100%) del crecimiento visual a las 48 h y para la TRB se consideró la concentración de antifúngico que produjo una inhibición $\geq$ al 80% del crecimiento visual a las 48 h.

Puntos de corte: Si bien los puntos de corte para testear la sensibilidad de hongos miceliales no han sido establecidos, para el análisis se utilizaron los puntos de corte de trabajo propuestos en documento M38-A2⁽¹³⁾. Así, para la AMB, el VRC y el ITC los aislados se agruparon como sensibles MIC $\leq$ 1 µg/mL, intermedio MIC 2 µg/mL y resistentes MIC $\geq$ 4 µg/mL. Con respecto a la TRB no hay datos de referencia de los rangos de CIM para *Aspergillus* spp., como tampoco han sido establecidos los puntos de corte para este antifúngico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudiaron un total de 51 aislados de *A. terreus* complex, 27 aislamientos ambientales y 24 clínicos. Todos identificados como *A. terreus* sensu stricto, tanto por tipificación convencional como por molecular.

A. terreus es un hongo cosmopolita que ha sido aislado del ambiente de las ciudades de Resistencia y Corrientes⁽¹⁴⁾ y, por otro lado, es uno de los patógenos oportunistas de oncomicosis más frecuentemente aislado en dicha región ⁽⁶⁾.

La mayoría de las investigaciones realizadas, muestran que *A. terreus* tiene resistencia intrínseca a la AMB con CIMs elevadas^(7,15,16). Lo mismo se observó en nuestro trabajo, donde la AMB presentó los valores más elevados de CIMs frente a todos los aislamientos estudiados con una CIM90 de 4 µg/mL. Algunos estudios han informado cepas con CIMs bajas (<1 µg/mL) frente a esta droga^(12,16,17). En nuestro trabajo sólo 6/24 aislados clínicos y 9/27 aislados ambientales mostraron CIMs de 1 µg/mL frente a la AMB. Estos hallazgos sugieren que pueden haber aislados de *A. terreus* sensu stricto sensibles a la AMB, pero se necesitan más investigación para saber si estos aislados representan variantes con sensibilidad a la AMB.

Aunque los puntos de corte para el género *Aspergillus* frente a la TRB no han sido establecidos por el documento M38-A2, esta droga mostró una potente actividad in vitro frente a todos los aislados de *A. terreus* testeados, con valores de CIMs más bajas (MIC90 de 0,25 µg/mL) que la AMB, el ITC y el VRC. Estos datos coinciden con los valores publicados por Moore et. al.⁽¹⁸⁾.

El uso del VRC para el tratamiento de las aspergilosis invasoras causadas por *A. terreus* mejoró la respuesta clínica de los pacientes^(9,10). Estos resultados obtenidos in vivo se relacionan con los datos obtenidos in vitro en nuestro trabajo, donde todos los valores de CIMs frente al VRC fueron bajos (CIM90 0,5 µg/mL), tanto para los aislados clínicos como para los ambientales. La misma situación se observó para ITC (CIM90 0,5 µg/mL), incluso algunos aislamientos mostraron CIMs más bajas que para VRC. Resultados similares fueron informados por otros autores, mostrando la alta actividad in vitro de estos antifúngicos⁽¹⁹⁻²²⁾. Contrariamente a lo hallado en países europeos y en Estados Unidos, donde se han informado algunas cepas de *A. terreus* con CIMs ≥2 µg/mL frente al VRC y al ITC^(7,13-15), en este trabajo no se han encontrado aislados resistentes o con sensibilidad intermedia a estos azoles.

Las pruebas de sensibilidad antifúngica son esenciales en el manejo del paciente y en la vigilancia de la resistencia. Poco es lo que se conoce acerca de la sensibilidad del complejo *A. terreus* a nivel mundial, menos aún en nuestro país. El presente estudio es una contribución al conocimiento de la sensibilidad de este hongo oportunista y muestra que los aislamientos de *A. terreus* sensu stricto obtenidos en esta región son sensibles a los azólicos ITC y VRC, tienen buena respuesta in vitro frente a la TRB pero exhiben CIMs elevadas frente a la AMB.

REFERENCIAS

1. Garnacho-Montero J, Olaechea P, Alvarez-Ilerma F, Alvarez-Rocha L, Galván B, Rodríguez A, Zaragoza R, Aguado J-M. 2013. Epidemiology, diagnosis and treatment of fungal respiratory infections in the critically ill patient. *Rev Esp Quim.* 26:173–188.
2. Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. 2006. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J. Med. Microbiol.* 55:809–18.
3. Blum G, Perkhofer S, Grif K, Mayr a, Kropshofer G, Nachbaur D, Kafka-Ritsch R, Dierich MP, Lass-Flörl C. 2008. A 1-year *Aspergillus terreus* surveillance study at the University Hospital of Innsbruck: molecular typing of environmental and clinical isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:1146–51.
4. Ozer B, Kalaci A, Duran N, Dogramaci Y, Yanat AN. 2009. Cutaneous infection caused by *Aspergillus terreus*. *J. Med. Microbiol.* 58:968–70.
5. Lass-Flörl C, Rath P, Niederwieser D, Kofler G, Würzner R, Krezy A, Dierich MP. 2000. *Aspergillus terreus* infections in haematological malignancies: molecular epidemiology suggests association with in-hospital plants. *J. Hosp. Infect.* 46:31–5.
6. Fernández MS, Rojas FD, Cattana ME, Sosa MDLÁ, Mangiaterra ML, Giusiano GE. 2013. *Aspergillus terreus* complex: an emergent opportunistic agent of Onychomycosis. *Mycoses* 56:477–81.
7. Meletiadi J, Antachopoulos C, Stergiopoulou T, Pournaras S, Roilides E, Walsh TJ. 2007. Differential fungicidal activities of amphotericin B and voriconazole against *Aspergillus* species determined by microbroth methodology. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3329–37.
8. Blum G, Perkhofer S, Haas H, Schrettl M, Würzner R, Dierich MP, Lass-Flörl C. 2008. Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1553–5.
9. Blum G, Hörtnagl C, Jukic E, Erbeznic T, Pümpel T, Dietrich H, Nagl M, Speth C, Rambach G, Lass-Flörl C. 2013. New insight into amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:1583–8.
10. Tortorano A, Prigitano A, Dho G, Biraghi E, Stevens D, Ghannoum M, Nolard N, Viviani M. 2008. In vitro activity of amphotericin B against *Aspergillus terreus* isolates from different countries and regions. *J Chemother* 20:756–757.
11. Herbrecht R, Denning D, Patterson T, Bennett J, Greene R, Oestmann J-W, Kern W, Marr K, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin R, Wingard J, Stark P, Durand C, Caillot D, Thiel E, Chandrasekar P, Hodges M, Schlamm H, Trope P, De Pauw B. 2002. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N. Engl. J. Med.* 347:408–415.
12. Walsh TJ, Pappas P, Winston DJ, Lazarus HM, Petersen F, Raffalli J, Yanovich S, Stiff P, Greenberg R, Donowitz G, Lee J. 2002. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N. Engl. J. Med.* 346:225–234.
13. Pfaller MA, Duncanson F, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. 2011. In vitro activity of a novel broad-spectrum antifungal, E1210, tested against *Aspergillus* spp. determined by CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Antimi-*

- cro. Agents Chemother. 55:5155–8.
14. Gomez-Lopez A, Garcia-Effron G, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2003. In Vitro Activities of Three Licensed Antifungal Agents against Spanish Clinical Isolates of *Aspergillus* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 47:3085–8.
 15. Misra R, Malik A, Singhal S. 2011. Comparison of the activities of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical and environmental isolates of *Aspergillus* species. Indian J. Pathol. Microbiol. 54:112–6.
 16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA, USA, 2008.
 17. Fernández M, Cattana M, Rojas F, Sosa M de los Á, Aguirre C, Vergara M, Giussiano G. 2014. Especies de *Aspergillus* en ambientes hospitalarios con pacientes pediátricos en estado crítico. Rev Iberoam Micol 31:176–181.
 18. Sutton D, Sanche S, Revankar S, Fothergill A, Rinaldi M. 1999. In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. J. Clin. Microbiol. 37:2343–5.
 19. Moore CB, Walls CM. 2001. In vitro activities of terbinafine against *Aspergillus* species in comparison with those of itraconazole and amphotericin B. Antimicrob. Agents Chemother. 45:1882–1885.
 20. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. 2003. Activities of Caspofungin, Itraconazole, Posaconazole, Ravuconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against 448 Recent Clinical Isolates of Filamentous Fungi. J. Clin. Microbiol. 41:3623–6.
 21. Garcia-Effron G, Gomez-Lopez A, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2004. In vitro activity of terbinafine against medically important non-dermatophyte species of filamentous fungi. J. Antimicrob. Chemother. 53:1086–9.
 22. Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, Kauffman CA, Kontoyannis DP, Ito JI, Balajee SA, Pappas PG, Moser SA. 2009. Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. J. Clin. Microbiol. 47:3271–5.

ABSTRACT

According with CLSI document M38-A2 the antifungal susceptibility of 51 clinical and environmental isolates of A. terreus sensu stricto against amphotericin B, terbinafine, itraconazole and voriconazole was performed. For itraconazole and voriconazole all isolates showed low MICs (MIC90 0,5 µg/mL) and the 70,6% of the isolates presented high amphotericin B MICs (MIC90 4 µg/mL). Terbinafine showed the lowest MICs. No significant differences were found when MICs of clinical and environmental isolates were compared.

ESTUDIO DEL PASAJE DE LAS DROGAS ANTICHAGÁSICAS A LA LECHE MATERNA EN MUJERES LACTANTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS

García-Bournissen, Facundo; Moroni, Samanta; Marson, Maria Elena;
Moscatelli, Guillermo; Mastrantonio, Guido; Bisio, Margarita; Cornou,
Laura; Ballering, Griselda; Altcheh, Jaime
Servicio de Parasitología y Chagas, Hospital de Niños "Ricardo Gutierrez",
Buenos Aires.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis endémica en Latinoamérica, causada por la infección con *Trypanosoma cruzi*.⁽¹⁻³⁾ La enfermedad se presenta con una fase aguda breve, seguida de una fase crónica asociada al desarrollo de complicaciones cardíacas y/o gastrointestinales en aproximadamente 30% de los pacientes infectados, años o décadas más tarde.^(4;5)

Hay aproximadamente 10 millones de infectados con la enfermedad de Chagas en Latinoamérica, predominantemente de bajo nivel socioeconómico, y en zonas desfavorecidas.^(2;6)

Solo dos drogas se encuentran actualmente disponibles para el tratamiento, nifurtimox (NFX) y benznidazol (BNZ), ambas con efectividad y limitaciones similares.^(3;7) Dada la naturaleza empírica de su descubrimiento y desarrollo, estas drogas han sido utilizadas durante décadas sin una comprensión acabada de sus mecanismos de acción, farmacocinética y toxicocinética. Ambas drogas presentan toxicidad significativa en los adultos, especialmente reacciones dermatológicas,^(3;7) pero la incidencia de eventos adversos (EA) en la población pediátrica es mucho menor.⁽⁸⁻¹²⁾ El BZN es el medicamento más comúnmente utilizado en Sud American en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, principalmente debido a razones de acceso y disponibilidad regional.⁽³⁾

Como consecuencia de la escasez de información sobre su seguridad durante el embarazo y la lactancia, el BNZ raramente se administra a mujeres lactantes debido al potencial riesgo de exponer a los bebés amamantados al medicamento a través de la leche materna. Por otro lado, la discontinuación de la lactancia para permitir el tratamiento de la enfermedad de Chagas en la madre no es aconsejable debido a la gran cantidad de beneficios que provee

la lactancia al bebé, incluyendo la promoción del crecimiento adecuado, del desarrollo inmunológico y cognitivo, entre otros beneficios^(13;14)

Lamentablemente, en áreas con alta frecuencia de embarazos y nacimientos, y acceso limitado al sistema de salud, el período del nacimiento y el postparto pueden ser una de las pocas ocasiones en las que una joven madre entrará en contacto con el sistema de salud y una de las pocas oportunidades que tendrá de recibir tratamiento para la enfermedad de Chagas. La indicación actual de evitar el tratamiento con BNZ durante la lactancia, basada no en la evidencia sino en la ausencia de la misma, puede llevar a oportunidades perdidas de tratamiento en este grupo de mujeres.⁽¹⁵⁾ Esta situación no es justificable sin información adecuada que permita evaluar el nivel de riesgo, si es que existe, del tratamiento durante la lactancia.

El objetivo de este estudio fue evaluar, por primera vez, la transferencia de BNZ a la leche materna en mujeres con enfermedad de Chagas, para cuantificar el riesgo de exposición al BNZ a través de la leche materna, y proveer evidencia para poder basar futuras recomendaciones de tratamiento.

POBLACIÓN Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio doce mujeres en período de lactancia con diagnóstico de enfermedad de Chagas crónica, y sus respectivos bebés. El estudio tuvo lugar entre Julio 2011 y Febrero 2012 en el Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina. Las participantes debían tener un diagnóstico de enfermedad de Chagas por al menos dos técnicas serológicas específica para anticuerpos anti *T.cruzi* (ELISA, Wiener, Rosario, Argentina; Hemaglutinación indirecta, Polychaco, Buenos Aires, Argentina).

Los candidatos se excluyeron de participar en el estudio si presentaban alguna condición médica que pudiera afectar la interpretación de los resultados (pore j, enfermedades sistémicas severas), si estaban embarazadas (según un test de embarazo realizado durante la etapa de evaluación), o antecedentes de hipersensibilidad al BNZ o alguno de sus componentes, o historia previa de tratamiento con el medicamento. Ninguna de las pacientes incluidas en el estudio estaban tomando otra medicación.

Tratamiento: BNZ oral 5 – 8 mg/kg/día en dos tomas (comprimidos de 100 mg, Radanil; Roche, Sao Paulo, Brazil), por 30 días.

Se obtuvieron una historia clínica detallada, examen físico y evaluación de laboratorio de rutina al diagnóstico, a los 7 y 30 días de tratamiento. La res-

puesta al tratamiento se evaluó por medio de la técnica de PCR al diagnóstico y al fin del tratamiento.^(16;17)

Diagnóstico de enfermedad de Chagas congénita: todos los niños menores de 8 meses fueron evaluados por medio de tests parasitológicos directos (microhematocrito) para diagnóstico de enfermedad de Chagas. Los niños con parasitemia negativa fueron re-evaluados a los 8 meses de edad con serología específica.⁽¹¹⁾

Todos los niños fueron evaluados por pediatras con experiencia en el tratamiento de la enfermedad de Chagas pediátrica, con particular énfasis en la evaluación del crecimiento y el desarrollo psicomotor. Las evaluaciones pediátricas se realizaron al diagnóstico materno, a los 7 y 30 días de tratamiento materno, y mensualmente luego del fin de tratamiento por al menos 6 meses. Los bebés con diagnóstico de enfermedad de Chagas recibieron tratamiento según normas de tratamiento del Servicio.

MÉTODOS ANALÍTICOS

Las muestras de leche materna (aproximadamente 30 ml) se recolectaron antes de la primera dosis de BNZ, y en los días 7 y 30 de tratamiento. Las muestras de leche individuales fueron homogeneizadas, se registró su volumen total y se separó una alícuota para análisis, guardándose el volumen restante para futuros estudios o reanálisis. Las muestras se guardaron a -20 C° hasta su utilización.

Las muestras de sangre venosa se obtuvieron en tubos heparinizados al mismo tiempo que las muestras de leche. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 g por 10 minutos y el plasma obtenido se guardó a -20 C° y se liofilizó previo al análisis.

Se utilizó la técnica de HPLC para la determinación de BNZ en leche y sangre, como se describió previamente.^(18;19) El límite de determinación (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) para las muestras de plasma fueron 0.14 microg/mL y 0.32 microg/mL respectivamente. El LOD y el LOQ para las muestras de leche fueron 0.3 microg/mL y 0.9 microg/mL respectivamente.

La relación de las concentraciones en leche y plasma se calculó en base a concentraciones únicas de leche y plasma para cada paciente. Se asumió una ingesta diaria de leche de 150 ml/kg/día para cada bebé en el estudio⁽²⁰⁻²²⁾ y se multiplicó este valor por las concentraciones de BNZ en la leche para obtener la estimación de la dosis diaria absoluta de BNZ del bebé (recibi-

da por medio de la lactancia), expresada en $\mu\text{g/kg/día}$. La dosis se expresó también como dosis relativa ("*relative infant dose*" –RID–), el porcentaje de la dosis diaria recibida por el bebé a través de la leche (por kg de peso) sobre la dosis diaria por kg de peso recibida por la madre.

ÉTICA

El protocolo fue aprobado por los comités de Investigación y Docencia, y de Bioética del Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez". Se obtuvo consentimiento informado por escrito de todos los pacientes. El protocolo se encuentra registrado en ClinicalTrials.gov (#NCT01547533).

RESULTADOS

Ingresaron en el estudio doce mujeres y sus respectivos bebés. La edad media y el peso medio de las madres era de 27 años (rango 20-34) y 56 kg (rango 45–110 kg), respectivamente. La edad media de los bebés fue de 6 meses (rango 20 días - 13 meses), y el peso medio de 7.2 kg (rango 4.4 - 10.2 kg). Todos los niños incluidos en el estudio estaban sanos, con peso y talla dentro de los percentiles 25 y 95 para sus respectivas edades. Cinco de los bebés recibían lactancia exclusiva, y seis también recibían semisólidos. La dosis maternal media de BNZ fue de 5.6 mg/kg/día (rango 3.6-6.6 mg/kg/día).

Cinco mujeres (45%) presentaron eventos adversos (EA) por el BNZ: 2 (18%) fueron leves y permitieron la continuación del tratamiento, 2 (18%) fueron moderados y llevaron a la discontinuación del tratamiento a los 19 y 22 días respectivamente. Un paciente (9%) presentó un EA severo (reacción de hipersensibilidad severa con eosinofilia y síntomas sistémicos) luego de 26 días de tratamiento, requiriendo hospitalización y discontinuación del tratamiento. Este fue el único caso en el que se suspendió la lactancia, a causa de la severidad de la reacción. Luego de la hospitalización, el paciente se recuperó ad integrum, y su bebé nunca presentó síntomas de EAs.

Se logró obtener muestras de leche de un total de 10 pacientes (83%). El examen físico y de laboratorio de los pacientes fue normal en todos los casos, excepto en el paciente que presentó una reacción de hipersensibilidad severa con síntomas sistémicos, que presentó linfocitosis, aumento de la fosfatasa alcalina y enzimas hepáticas. A pesar de las recomendaciones repetidas de

utilización de contracepción adecuada, 2 pacientes se embarazaron dentro de las 3 semanas de haber discontinuado el tratamiento. Ambos embarazos prosiguieron sin inconvenientes, y los bebés nacieron sin ningún tipo de problemas o complicaciones. Llamativamente, ninguno de los dos bebés resultó positivo para la infección congénita con T cruzi.

Se obtuvieron un total de 16 muestras de leche y 16 de sangre, de 10 pacientes. Las muestras de leche se obtuvieron en promedio al octavo día de tratamiento (rango 6 – 9), por lo que se asume que todas las pacientes se encontraban en el estadio estacionario. La concentración plasmática media de BNZ fue de 6.05 mg/L (SD 3.85; rango 0.3-12.6 mg/L) y de 3.58 mg/L en leche (SD 1.4; rango 0.3-5.9). Mean milk/plasma BNZ concentration ratio (MPR) was 0.88 (SD 0.73; range 0.3-2.79). Se observe una correlación positiva entre las concentraciones plasmáticas y las concentraciones en leche (Figura 1).

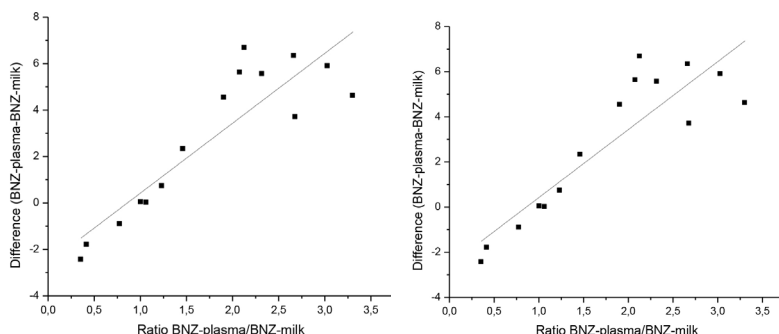


Figura 1: Correlación entre las concentraciones en leche y en plasma de BNZ

Asumiendo una ingesta diaria de leche de 150 ml/Kg por parte de los bebés, la exposición media absoluta diaria a BNZ a través de la leche materna sería de 0.65 mg/kg/day, representando una dosis relativa (RID) del 12.3% de la dosis materna (ajustada por kg de peso) (SD 2.9%, rango 5.45 - 17%).

No se observaron EAs en los bebés amamantados, ni ningún cambio en el comportamiento, progreso de peso ni en otros aspectos potencialmente atribuible a la exposición al BNZ. Todos los bebés se mantuvieron sanos y en buen estado general durante la duración del estudio, según la evaluación pediátrica periódica.

DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas se puede transmitir a los humanos por medio del contacto con vectores triatomínidos, popularmente conocidos como “vinchucas”, por transmisión congénita, y por transfusiones o transplante de órganos. La transmisión oral, por medio de comida o bebidas contaminada, ha sido descrita recientemente en el contexto de brotes epidémicos.^(3;23-25) La presencia del T cruzi en la leche humana es controvertida, y ha sido demostrada en escasas ocasiones, casi exclusivamente en pacientes que presentaban lesiones mamarias (por ej, pezones sangrantes) durante el período de infección aguda con T cruzi. A pesar de que el riesgo exacto de transmisión de la enfermedad a través de la leche materna no ha sido claramente establecido, es improbable que sea significativo, y la enfermedad de Chagas materna no se considera una contraindicación para la lactancia.⁽²⁶⁻²⁸⁾

En áreas rurales, con limitado acceso al sistema de salud, la posibilidad de contacto de las mujeres jóvenes con los servicios de salud puede ser limitada fuera del puerperio. Asimismo, en zonas con alta frecuencia de embarazos por individuo, el corto período inter-embarazo limitaría la posibilidad de tratar a una mujer con enfermedad de Chagas fuera de los períodos de lactancia. Esta situación obliga al equipo de salud a elegir entre tratar a la madre y apoyar la lactancia, una elección difícil si se tiene en cuenta que las recomendaciones actuales apoyan la lactancia exclusiva por al menos los primeros 6 meses de vida del bebé (y en combinación con semisólidos por al menos 6 meses más).^(13;15;29)

Nuestros resultados muestran que la concentración en leche es proporcional a la concentración en plasma (figura 1), siguiendo el principio general que afirma que las concentraciones de las drogas en leche son generalmente bajas y que raramente estarán en rangos que puedan presentar riesgos significativos por el bebé.^(30;33)

Asumiendo una ingesta diaria de leche por parte del bebé de 150 ml/kg/día, se podría esperar una exposición máxima del 12% de la dosis materna (por kg de peso), un nivel de exposición generalmente considerado relativamente bajo^(30;31;34), y que, en el caso de BNZ, no es esperable que produzca efectos observables en los bebés como demostramos en este estudio.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio, el primero en su tipo en la enfermedad de Chagas, indican que el BNZ es compatible con la lactancia gracias a una transferencia limitada del BNZ a la leche materna y a la consecuente baja exposición del bebé amamantado a través de la leche.

Nuestro estudio permitiría el tratamiento de la enfermedad de Chagas materna durante la lactancia, una práctica con potencial de beneficiar a un número significativo de mujeres jóvenes con esta enfermedad.

REFERENCIAS

1. Barry MA, Weatherhead JE, Hotez PJ, Woc-Colburn L. Childhood parasitic infections endemic to the United States. *Pediatr Clin North Am* 2013 Apr;60(2):471-85.
2. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 2010 Jul;115(1-2):14-21.
3. Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007 Oct 30;102 Suppl 1:95-7.
4. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 2006 May 16;144(10):724-34.
5. Viotti R, Vigliano C, Armenti A. A risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med* 2006 Dec 7;355(23):2489-1.
6. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007 Oct 30;102 Suppl 1:75-85.
7. Viotti R, Vigliano C. Etiological treatment of chronic Chagas disease: neglected 'evidence' by evidence-based medicine. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007 Aug;5(4):717-26.
8. Altcheh J, Moscatelli G, Mastrantonio G, Moroni S, Giglio N, Freilij H, et al. Population pharmacokinetics study of benznidazole in children with Chagas disease. *Worldpharma* 201 (IUPHAR). 2010.
9. Altcheh J, Moscatelli G, Moroni S, Garcia-Bournissen F, Freilij H. Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. *Pediatrics* 2011 Jan;127(1):e212-e218.
10. de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida SS, Luquetti A, Travassos LR, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 1996 Nov 23;348(9039):1407-13.
11. Freilij H, Altcheh J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis* 1995 Sep;21(3):551-5.
12. Sosa ES, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of

- chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1998 Oct;59(4):526-9.
13. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2012 Mar;129(3):e827-e841.
 14. Burton OM. The American Academy of Pediatrics and breastfeeding. *Breastfeed Med* 2012 Oct;7(5):334-6.
 15. Garcia-Bournissen F, Altcheh J, Panchaud A, Ito S. Is use of nifurtimox for the treatment of Chagas disease compatible with breast feeding? A population pharmacokinetics analysis. *Arch Dis Child* 2010 Mar;95(3):224-8.
 16. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3(4):e419.
 17. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(1):e2000.
 18. Marson ME, Dana DD, Altcheh J, Garcia-Bournissen F, Mastrantonio G. Development of UV/HPLC methods for quantitative analysis of benznidazole in human plasma and urine for application in pediatric clinical studies. *J Clin Lab Anal* 2013 Sep;27(5):384-90.
 19. Marson ME, Padro JM, Reta MR, Altcheh J, Garcia-Bournissen F, Mastrantonio G. A simple and efficient HPLC method for benznidazole dosage in human breast milk. *Ther Drug Monit* 2013 Aug;35(4):522-6.
 20. Panchaud A, Garcia-Bournissen F, Csajka C, Kristensen JH, Taddio A, Ilett KF, et al. Prediction of infant drug exposure through breastfeeding: population PK modeling and simulation of fluoxetine exposure. *Clin Pharmacol Ther* 2011 Jun;89(6):830-6.
 21. Kent JC, Mitoulas L, Cox DB, Owens RA, Hartmann PE. Breast volume and milk production during extended lactation in women. *Exp Physiol* 1999 Mar;84(2):435-47.
 22. Kent JC, Mitoulas LR, Cregan MD, Ramsay DT, Doherty DA, Hartmann PE. Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day. *Pediatrics* 2006 Mar;117(3):e387-e395.
 23. Gurtler RE, Diotaiuti L, Kitron U. Commentary: Chagas disease: 100 years since discovery and lessons for the future. *Int J Epidemiol* 2008 Aug;37(4):698-701.
 24. Jackson Y, Getaz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardin A, et al. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(2):e592.
 25. Sanchez LV, Ramirez JD. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology* 2013 Feb;140(2):147-59.
 26. Bittencourt AL, Sadigursky M, Da Silva AA, Menezes CA, Marianetti MM, Guerra SC, et al. Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988 Jan;83(1):37-9.
 27. Campos R, Pinto PL, Moreira AA, Amato N, V, Duarte MI, de Sant'Ana EJ, et al. [Experimental study on the transmission of Chagas' disease by milk]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1988 May;43(3):146-7.

28. Ferreira CS, Martinho PC, Amato N, V, Cruz RR. Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001 May;43(3):161-2.
29. Watson CP, Dogruel M, Mihoreanu L, Begley DJ, Weksler BB, Couraud PO, et al. The transport of nifurtimox, an anti-trypanosomal drug, in an in vitro model of the human blood-brain barrier: evidence for involvement of breast cancer resistance protein. *Brain Res* 2012 Feb 3;1436:111-21.
30. Ito S. Drug therapy for breast-feeding women. *N Engl J Med* 2000 Jul 13;343(2):118-26.
31. McNamara PJ, Abbassi M. Neonatal exposure to drugs in breast milk. *Pharm Res* 2004 Apr;21(4):555-66.
32. Workman P, White RA, Walton MI, Owen LN, Twentyman PR. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. *Br J Cancer* 1984 Sep;50(3):291-303.
33. Sachs HC. The transfer of drugs and therapeutics into human breast milk: an update on selected topics. *Pediatrics* 2013 Sep;132(3):e796-e809.
34. Rowe H, Baker T, Hale TW. Maternal medication, drug use, and breastfeeding. *Pediatr Clin North Am* 2013 Feb;60(1):275-94.
35. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, Petti M, Bertocchi G, et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009 Mar;7(2):157-63.

ABSTRACT

Background: benznidazole (BNZ) is safe and effective for the treatment of pediatric Chagas disease. Treatment of adults is also effective in many cases, but discouraged in breast feeding women because no information on BNZ transfer into breast milk is available. We aimed to evaluate the degree of BNZ transfer into breast milk in lactating women with Chagas disease.

Patients and methods: Prospective cohort study of lactating women with Chagas disease treated with BNZ administered for 30 days. Patients and their breastfed infants were evaluated at admission, the 7th and 30th day of treatment (and monthly thereafter, for 6 months). BNZ was measured in plasma and milk by HPLC. The protocol was registered in ClinicalTrials.gov (#NCT01547533).

Results: Twelve lactating women with chronic Chagas disease were enrolled (mean age 27 years, range 20-34). Mean BNZ dose was 5.6 mg/kg/day BID. Five mothers had adverse drug events (45%), but no ADRs or any untoward outcomes were observed in the breastfed infants. Mean milk BNZ concentration was 3.58 mg/l (range 0.3-5.9) and 6.05 mg/l (range 0.3-12.6) in plasma. Mean BNZ milk / plasma ratio was 0.88 (range 0.3-2.79). Mean rela-

tive BNZ dose received by the infant (assuming a daily breastmilk intake of 150 ml/kg/day) was 12% of the maternal dose per kg (range 5.5-17%).

Conclusions: The limited transference of BNZ into breastmilk, and the reassuring normal clinical evaluation of the breastfed babies suggest that maternal BNZ treatment for Chagas disease during breastfeeding is unlikely to present a risk for the breastfed infant.

CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR TH17 EN MUCOSA CERVICAL Y EN SANGRE PERIFÉRICA EN INDIVIDUOS HIV+ NO PROGRESORES A LARGO PLAZO VS PROGRESORES A SIDA

M. Magdalena Gherardi

Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS, ex Centro
Nacional de Referencia para el SIDA)

OBJETIVO GENERAL

Análisis de la proporción de células Th17, Treg y del balance Th17/Treg en cohortes de individuos que se encuentran en distintos estadios de la infección por HIV. Posterior estudio de la correlación de estos parámetros con los niveles de activación inmune presentes en los diferentes grupos.

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos implicados en la inmunopatogénesis de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, del inglés human immunodeficiency virus) y el desarrollo de enfermedad son sumamente complejos. Así, los factores determinantes mediante los cuales algunas personas infectadas por HIV controlan la progresión a la enfermedad, mientras que otros la desarrollan rápidamente no están del todo dilucidados. Descubrir cuáles son los componentes del sistema inmune que participan en estas respuestas tan divergentes es fundamental para poder identificar nuevas formas de control y quizás la erradicación de la enfermedad. Las células T helper 17 (Th17) constituyen una sub-población de linfocitos T CD4+ recientemente descrito, proveniente de un linaje diferente al de las células Th1 y Th2^(1,2). Estudios recientes indican que tanto en modelos de infección de primates con lentivirus como en personas HIV+, la patogénesis de la infección y la progresión a enfermedad están asociadas con la pérdida de células Th17 y a su vez por un aumento en la frecuencia de las células T regulatorias (Treg)⁽³⁻⁵⁾. A su vez, el sistema inmune de mucosas juega un rol preponderante en la infección y patogénesis de la enfermedad, por lo cual el análisis tanto de los factores inmunes

presentes en mucosas en el momento de la infección como el impacto de ésta sobre dichos entornos es fundamental para ayudar al esclarecimiento de los mecanismos que operan en HIV/SIDA. El objetivo general de este proyecto se basa en el análisis de la proporción de células Th17 y del balance Th17/Treg en cohortes de individuos que poseen distintos niveles de protección frente a la infección, correlacionando dicho análisis con los niveles de activación inmune presentes en los diferentes grupos. Los resultados de este estudio contribuirán al esclarecimiento de tópicos sobre HIV/SIDA recientemente descriptos como la definición del papel de Th17 en la infección e inmunidad frente al virus. Estos aportes serán de gran importancia en el contexto del diseño tanto de nuevas drogas y terapias antirretrovirales (TARV) como de vacunas contra HIV.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL ESTUDIO

1. Caracterización en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la proporción de células Th17, y de las relaciones Th17/Treg
2. Estudio del impacto del tratamiento antirretroviral sobre la restauración de las subpoblaciones Th17, Treg y su balance en sangre periférica y tracto genital femenino.
3. Estudiar la correlación entre los parámetros medidos en 1 y 2 con parámetros de seguimiento de la infección y progresión a SIDA, comparando los distintos grupos.

El objetivo de la primera parte del trabajo consistió en la evaluación de la dinámica de las sub-poblaciones de Th17 y Treg y la relación entre ellas (Th17/Treg) en muestras de sangre periférica en diferentes etapas de la infección por HIV. Para ello se compararon grupos de pacientes con distintos niveles de inmunidad natural frente al virus. Asimismo nos propusimos investigar las posibles correlaciones entre estas sub-poblaciones por un lado con parámetros clínicos de seguimiento de la infección y, por el otro, con la respuesta T CD8 HIV específica previamente caracterizada como protectora.

Las características inmunológicas y virológicas de los diferentes grupos de pacientes se muestran en la Tabla 1. Los pacientes de infección aguda

Tabla 1. Características de los grupos de pacientes infectados con HIV

Grupo	Muestra (n)	Días post-infección mediana (IQR)	Edad en años, mediana (IQR)	Log ₁₀ CV ^a , media ± DS	Recuento de CD4 ^b , mediana células/μl (IQR)	Relación CD4/CD8, mediana (IQR)
Cohorte Infección Aguda	Basal (n = 40)	75 (50-120)	32 (23-37)	4.52 ± 1.10	577 (388-681)	0.50 (0.27-0.79)
	Año (n = 22)	330 (300-360)	35 (24-39)	4.27 ± 0.84	480 (396-660)	0.57 (0.35-0.91)
IA PR	Basal (n = 11)	55 (30-98)	37 (27-40)	4.98 ± 0.85	282 (222-379)	0.23 (0.12-0.33)
IA PT	Basal (n = 29)	90 (60-120)	30 (23-36)	4.35 ± 1.14	603 (515-741)	0.60 (0.40-0.87)
ECs	≥ 5 años (n = 13)	-	37 (33-44)	< 1.70	599 (559-894)	1.54 (0.61-2.38)
Crónicos	≥ 3 años (n = 9)	-	34 (25-36)	4.62 ± 0.83	139 (5-498)	0.12 (0.01-0.39)

IA: infección aguda. PR: progresores rápidos. PT: progresores típicos. ECs: del inglés elite controllers. IQR: rango intercuartil. DS: desvío estándar. CV: carga viral. PR y PT son sub-grupos de pacientes de IA que sufrieron (PR) o no (PT) caídas en sus recuentos de CD4 por debajo de 350 células/μl en algún momento durante el primer año post-infección (p.i.).

^a: Versant HIV-1 RNA 3.0 assay, Siemens. Los límites de detección son 500.000 y 50 copias de RNA/μl (5.7 y 1.7 Log₁₀).

^b: Citometría de flujo, doble plataforma. FACSCanto. BD Biosciences.

(en adelante IA) fueron reclutados a tiempos tempranos post-infección (p.i) (mediana de 75 días). Estos pacientes fueron subdivididos en progresores rápidos (PR) y típicos (PT) de acuerdo a si sus recuentos de CD4 hubiesen decaído o no, por debajo de 350 células/μl durante el primer año, respectivamente. Estos sub-grupos mostraron diferencias significativas en sus recuentos CD4 y la relación CD4/CD8 (todos los $p < 0.0001$) tanto a nivel basal (ver medianas en Tabla 1) como a tiempos tardíos (datos no mostrados). En primer lugar se caracterizaron las sub-poblaciones Th17 y Treg y su relación en muestras de sangre periférica en todos los grupos de pacientes con el objetivo de contrastar lo que ocurre a tiempos tempranos p.i y durante el primer año en relación a lo que se observa en grupos de pacientes con infección establecida (crónicos y ECs).

Se observó un declive gradual de células Th17 con el avance de la infección (Fig. 1A). Durante la IA a nivel basal los valores fueron indistinguibles de los hallados en dadores sanos (DS), y al año p.i se observó una tendencia a la disminución de Th17. A tiempos más avanzados (pacientes crónicos) la depleción de esta sub-población resultó significativa evidenciándose diferencias con el resto de los grupos. Los ECs preservaron esta sub-población en comparación con los pacientes crónicos. En lo que respecta a la frecuencia de células Treg, sólo en etapas avanzadas de la

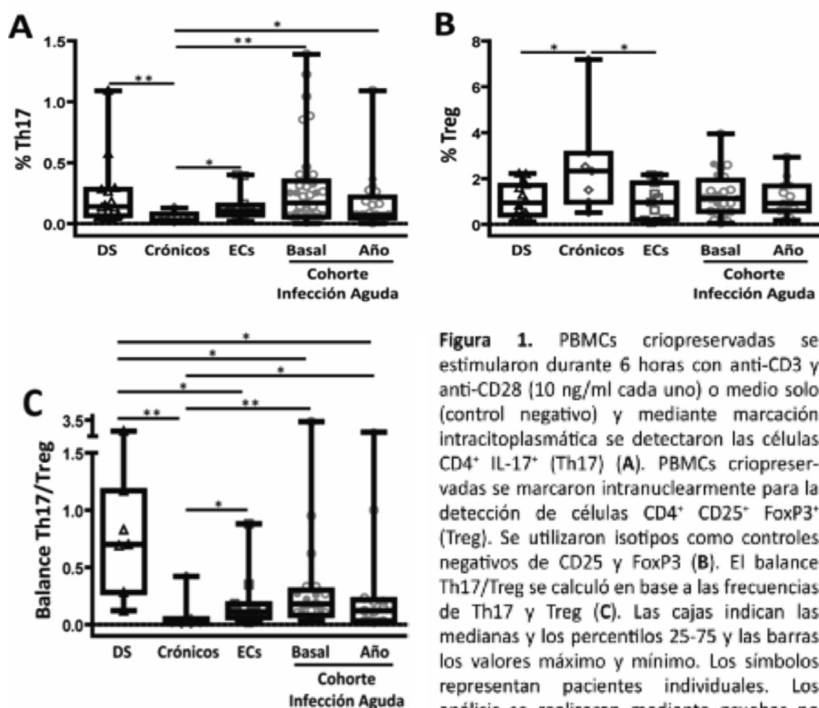


Figura 1. PBMCs criopreservadas se estimularon durante 6 horas con anti-CD3 y anti-CD28 (10 ng/ml cada uno) o medio solo (control negativo) y mediante marcación intracitoplasmática se detectaron las células $CD4^+ IL-17^+$ (Th17) (A). PBMCs criopreservadas se marcaron intranuclearmente para la detección de células $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ (Treg). Se utilizaron isotipos como controles negativos de CD25 y FoxP3 (B). El balance Th17/Treg se calculó en base a las frecuencias de Th17 y Treg (C). Las cajas indican las medianas y los percentilos 25-75 y las barras los valores máximo y mínimo. Los símbolos representan pacientes individuales. Los análisis se realizaron mediante pruebas no paramétricas. Los p obtenidos se ilustran como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

infección (crónicos) se evidenció una expansión significativa en comparación con DS y ECs (Fig. 1B). El % de Treg no resultó afectado en el grupo de infección aguda. Al analizar lo que ocurrió con la relación Th17/Treg (Fig. 1C), todos los pacientes infectados con HIV mostraron una alteración respecto a los DS, incluso los ECs. El desbalance resultó significativo desde etapas tempranas (muestras basales de IA) y en etapas avanzadas (crónicos) se observó su máximo grado de severidad, diferenciándose del resto de los grupos. Hasta la fecha, sólo algunos trabajos han evaluado estas sub-poblaciones en la infección aguda^(6,7), y ninguno de ellos incluyó un grupo de DS, el cual nos permitió detectar el rápido desbalance entre Th17/Treg en etapas tempranas de la infección por HIV en comparación con los valores normales hallados en pacientes no infectados. Esta disminución

rápida en la relación Th17/Treg es especialmente importante al ser interpretado en el contexto de un trabajo previo realizado en el modelo de SIV por Favre et.al. (8). En ese estudio los autores mostraron que la infección aguda de SIV en macacos se caracterizaba por una pérdida rápida y selectiva tanto de células Th17 como de la relación Th17/Treg, en sangre y múltiples

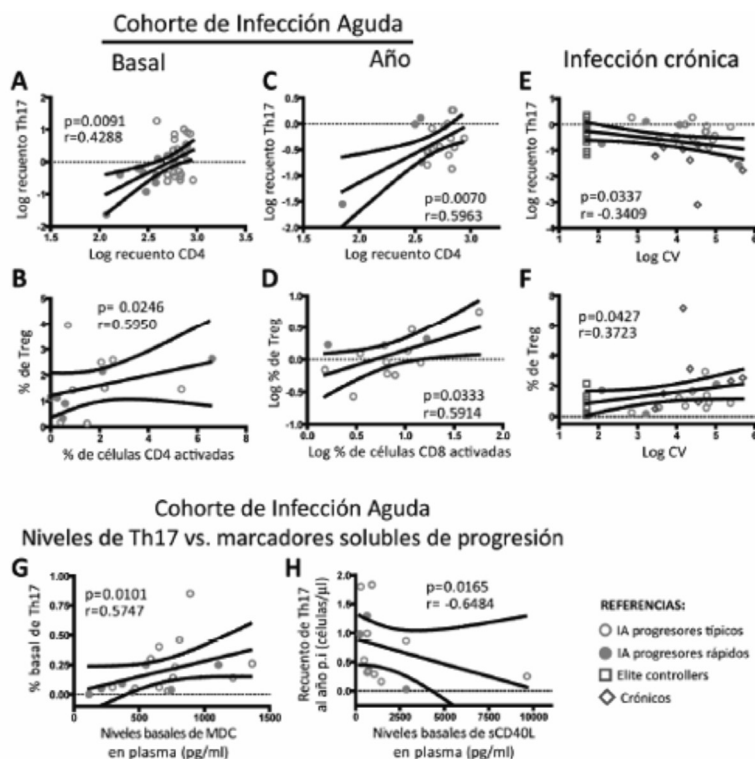


Figura 2. Correlaciones entre los niveles de Th17 y Treg y parámetros clínicos de seguimiento de la infección. Dentro de la cohorte de IA se observaron correlaciones a nivel basal (A y B) y al año (C y D) con los niveles de CD4 y de activación inmune. Las correlaciones presentes en la etapa crónica de la infección (muestras de pacientes crónicos, ECs, y cohorte de IA al año p.i. en el mismo análisis) E y F. Por último se ilustran las correlaciones halladas entre los niveles de Th17 y marcadores solubles de progresión (G y H). La concentración plasmática de MDC (del inglés, macrophage-derived chemokine) y sCD40L (del inglés, soluble CD40 ligand) se midieron mediante la técnica de Luminex.

tejidos, en relación directa con la progresión a enfermedad. Esta depleción temprana de células Th17 podría impactar la función de la mucosa intestinal. En relación a esto, un trabajo reciente resalta la importancia de la iniciación temprana de TARV para recuperar la homeostasis intestinal mediante la restauración de sub-poblaciones linfocitarias ⁽⁹⁾. Lo expuesto en los párrafos precedentes sugiere la existencia de una influencia inicial de la sub-población Th17 y de la relación Th17/Treg durante la infección por HIV. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue analizar las posibles correlaciones entre las sub-poblaciones de interés y parámetros clínicos de seguimiento de la infección.

La Figura 2 muestra las correlaciones más importantes halladas. Durante el primer año de la infección por HIV, se observó que la preservación de la sub-población de células Th17 se asoció positivamente con los recuentos de CD4 (Fig. 2 A y C), mientras que las Treg se correlacionaron con mayores niveles de activación de células CD4 (Fig. 2B) y CD8 (Fig. 2D). Al realizar un análisis de lo que ocurre en etapas crónicas de la infección en el conjunto de los pacientes, se observó que la CV se correlacionó negativamente con los niveles de Th17 (Fig. 2E) y positivamente con la frecuencia de Treg (Fig. 2F). Dado que la función de las Treg es la supresión de respuestas T, se podrían esperar relaciones negativas entre los niveles de esta subpoblación y la activación inmune. Sin embargo, nuestros resultados mostrando claras correlaciones positivas con la activación inmune y la CV se encuentran en concordancia con un trabajo reciente de Brandt et.al⁽¹⁰⁾ el cual describe correlaciones positivas entre las Treg y los niveles de activación y proliferación en diferentes grupos de pacientes infectados. Incluso, otro estudio reciente realizado en personas infectadas con HIV del subtipo C, demostró que durante la infección las Treg se correlacionaban positivamente con la CV y la progresión de la enfermedad, apoyando la hipótesis del rol detrimental de esta sub-población durante la infección por HIV⁽¹¹⁾. No sólo los parámetros clínicos típicos de seguimiento, sino también factores solubles relacionados con la progresión de la enfermedad, se correlacionaron con los niveles de Th17 durante la IA. Observamos que los niveles plasmáticos de MDC se correlacionaron positivamente con el porcentaje de Th17 a nivel basal (Fig. 2G) y que niveles basales plasmáticos de sCD40L se correlacionaron negativamente con los niveles de Th17 al año p.i (Fig. 2H). MDC es una quimiocina que tiene la capacidad de inhibir la replicación de HIV-1 in vitro y se encuentra aumentada en el plasma de pacientes asintomáticos comparados con pacientes con SIDA^(12,13). Por

el contrario, sCD40L constituye un biomarcador asociado con progresión, que contribuye a la inmunosupresión favoreciendo la expansión de células Treg⁽¹⁴⁾. Estos resultados sugieren que la preservación de la sub-población Th17 tiene un impacto positivo en el estado clínico de los pacientes en término de recuentos CD4, CV y marcadores solubles de progresión. Por el contrario, la expansión de células Treg se asoció con mayores niveles de activación inmune y replicación viral.

SEGUNDA PARTE:
MUESTRAS DE TRACTO GENITAL FEMENINO

Estudio del impacto del tratamiento antirretroviral sobre la restauración de las subpoblaciones Th17, Treg y su balance en sangre periférica y tracto genital femenino.

Las características de las pacientes que participaron en esta parte del estudio se detallan en la siguiente Tabla

Tabla 2. Características de los individuos crónicamente infectados conHIV-1 seleccionados para el estudio

Grupo	Muestra (nº de indivi- duos)	Edad(años), mediana (IQ)	Log ₁₀ CV ^a , media±DS	Tiempo bajo HAART (años), mediana (IQ)	Recuento de células T CD4 ^b , mediana del nº de células/ µl (IQ)	Recuento de células T CD8 ^b , mediana del nº de células/ µl (IQ)	Relación CD4/ CD8, mediana (IQ)
TARV-	n=22	32 (23-37)	4.52±0.91	---	348 (44-555)	959 (540-1243)	0.25 (0.05-0.44)
TARV+	n=19	41 (37-47)	<1.70	7 (4-16)	556 (376-596)	709 (458-787)	0.73 (0.53-0.99)

Con el objetivo de estudiar el impacto del tratamiento antirretroviral sobre la potencial restauración de las subpoblaciones Th17 y Treg en sangre periférica, en primer lugar se procedió a determinar las proporciones de estas subpoblaciones y su balance en PBMCs mediante citometría de flujo. Pudo observarse que las proporciones de célulasTh17 (% de células Th17) resultaron mayores en el grupo TARV+ en relación a lo observado en individuos TARV-[0.45%(0.30-0.61) en TARV+vs.0.05% (0.02-0.08) en TARV-; p=0.001; Figura 3A] y, asimismo, los niveles de Th17 de pacientes TARV+ resultaron similares a los hallados en DSs [0.18% (0.14-0.31); Figura 3A]. Cabe destacar

que, como se observa en la Figura 3B, el tratamiento restableció tanto las proporciones como la funcionalidad de esta subpoblación (en relación a la capacidad de cada célula de producir IL-17), siendo similar la IMFr de IL-17 en individuos TARV+[21.06 (12.86-34.39)] en relación a la observada en DSs[13.48 (9.07-19.43)] y ambos significativamente mayores a lo observado en pacientes TARV- [8.16 (4.41-9-86); vs. TARV+ $p=0.0001$ y vs. DSs $p=0.0013$; Figura 3B].

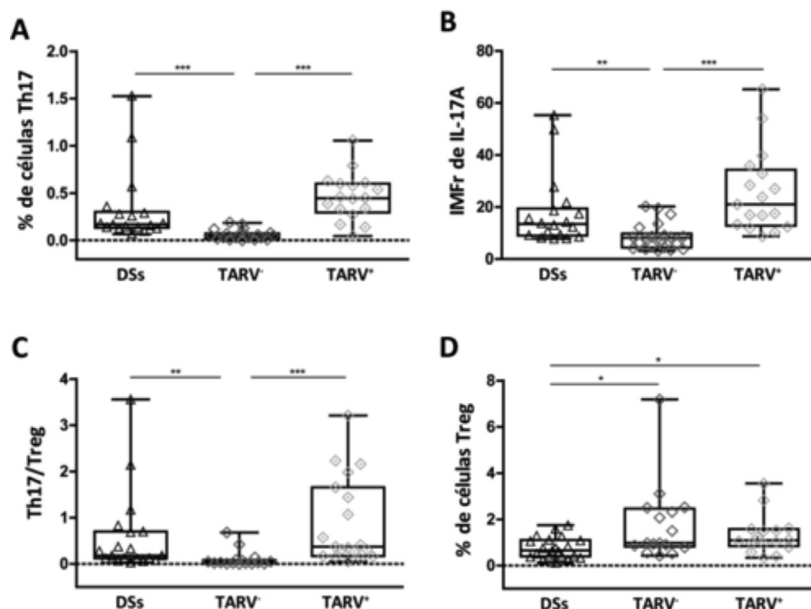


Figura 3: Restauración de la proporción y funcionalidad de la subpoblación Th17 y de la relación Th17/Treg en individuos crónicamente infectados bajo tratamiento antirretroviral. PBMCs fueron estimuladas durante 6 horas en presencia de una mezcla de los anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 o en medio completo solo (control de background) previo a su marcación intracelular. Se muestran los valores de frecuencia de células Th17 luego de sustraer el background (A) y de intensidad media de fluorescencia relativa (IMFr) de IL-17 (B). Valores de frecuencia de células Treg (D). La relación Th17/Treg fue calculada para cada individuo (C). La línea dentro de las cajas indica el valor de la mediana, mientras que sus límites delimitan los percentiles 25-75 y las barras indican los valores máximo y mínimo. Cada símbolo representa pacientes individuales: Dadores sanos (Δ , DSs), individuos crónicos naïve de tratamiento antirretroviral ($\diamond$, TARV-) y bajo tratamiento ($\diamond$, TARV+). Se indican los valores de p obtenidos: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$.

Del mismo modo, al estudiar lo que ocurría con el balance Th17/Treg se pudo observar que, tras el tratamiento, la relación aumenta llegando a valores normales [0.37 (0.17-1.66) en TARV+ vs. 0.18 (0.12-0.70) en DSs; Figura 30C], en contraste a lo observado en individuos TARV- cuya relación Th17/Treg resultó significativamente menor comparada con ambos grupos [0.03 (0.01-0.09) vs. TARV+ $p=0.0001$ y vs. DSs $p=0.003$; Figura 30C]. Por el contrario, al analizar el compartimiento de la subpoblación de células Treg, pudo observarse que en individuos crónicamente infectados por HIV, el tratamiento no tiene un efecto sobre las proporciones de estas células, las cuales se mantienen en niveles similares a lo observado en pacientes TARV- [0.97% (0.81-2.46) en TARV- vs. 1.08% (0.84-1.57) en TARV+; Figura 30D], y ambos grupos muestran mayores valores de Treg en relación a DSs [0.65% (0.40-1.10) vs. TARV- $p=0.012$ y vs. TARV+ $p=0.03$; Figura 30D]. En resumen, esta sección muestra que el tratamiento antirretroviral con supresión efectiva de la CV plasmática resulta en la restauración de la subpoblación de células Th17 y del balance Th17/Treg en muestras de sangre periférica, a pesar de que no logra revertir las altas proporciones de células Treg en pacientes infectados.

En resumen, los resultados de la Figura 3 muestran que el tratamiento antirretroviral resulta en la restauración de la subpoblación de células Th17 y del balance Th17/Treg en muestras de sangre periférica, a pesar de que no logra revertir las altas proporciones de células Treg en pacientes infectados.

El siguiente objetivo consistió en analizar el efecto del tratamiento antirretroviral sobre la subpoblación de células T CD4+CD161+ en sangre periférica (precursoras de Th17 que migran a intestino) y sobre las principales citoquinas que ejercen funciones efectoras de las subpoblaciones Th17 y Treg en sitios de mucosas, haciendo especial énfasis en el tracto genital femenino, que constituye en primer sitio de contacto con el virus tras su transmisión heterosexual.

En la Figura 4A se muestra que los recuentos de células T CD4+ CD161+ se encuentran severamente disminuidos en individuos HIV+, independientemente de si se encuentran o no bajo tratamiento, en comparación a lo observado en DSs [125.60 (64.85-175.50) células/ul en DSs vs. 28.60 (19.14-34.04) células/ul en TARV- $p=0.001$, y vs. 43.09 (34.14-103.10) células/ul en TARV+ $p=0.001$; Figura 4A], sugiriendo que, aún bajo supresión efectiva de la CV plasmática, la restauración de la subpoblación Th17 con capacidad de migrar a GALT es incompleta.

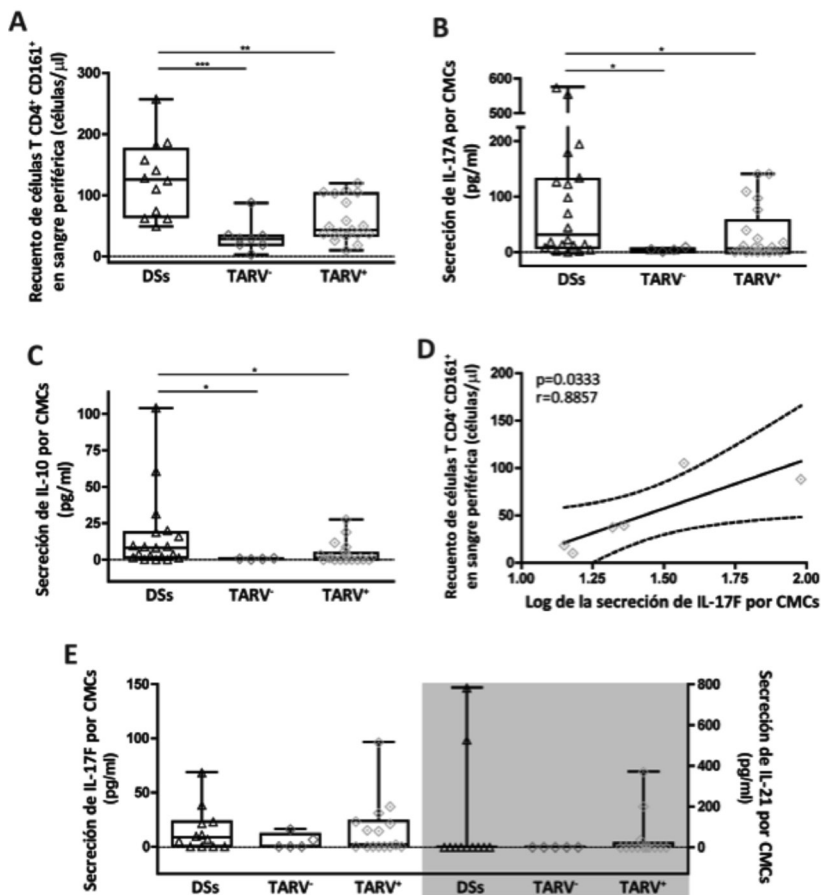


Figura 4: Niveles de la subpoblación T CD4⁺ CD161⁺ en sangre periférica y producción de las citoquinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-10 tras la estimulación de células mononucleares de cérvix (CMCs). La frecuencia de células T CD4⁺ CD161⁺ fue determinada en PBMCs estimuladas durante 6 horas con anti-CD3 y anti-CD28 por citometría de flujo (A). Cuantificación de la concentración de IL-17A (B), IL-10 (C), IL-17F e IL-21 (E) en sobrenadantes de CMCs estimuladas durante 8 horas con PMA/Ionomicina. Correlación positiva hallada dentro del grupo de individuos TARV⁺ entre: Log de la concentración de IL-17F en sobrenadante de CMCs estimuladas vs. recuento de células T CD4⁺ CD161⁺ en sangre periférica (D). Los símbolos distinguen pacientes individuales de los diferentes grupos. TARV⁺: individuos crónicamente infectados por HIV que se encuentran bajo

tratamiento antirretroviral. TARV-: individuos crónicamente infectados por HIV naïve de tratamiento antirretroviral. DSs: dadores sanos, seronegativos para la infección por HIV. La línea dentro de las cajas indica el valor de la mediana, mientras que sus límites delimitan los percentiles 25-75 y las barras indican los valores máximo y mínimo. Se indican los valores de p obtenidos: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ (A-C y E). Los valores de r y p indicados corresponden a una correlación de Spearman (C).

Se pudo observar que, las CMCs (células mononucleares de cérvix) provenientes de las pacientes del grupo TARV+ no logran los niveles de secreción de IL-17A e IL-10 observados en DSs [32.88 pg/ml (9.09-131.80) de IL-17A en DSs vs. 7.83 pg/ml (0.55-57.83) de IL-17A en TARV+ $p = 0.031$, Figura 4B; 8.10 pg/ml (1.47-18.75) de IL-10 en DSs vs. 1.27 pg/ml (0.04-4.51) de IL-10 en TARV+ $p = 0.013$, Figura 4C]. Cabe destacar que, aunque también se observaron diferencias entre DSs y pacientes TARV- para ambas citoquinas [4.60 pg/ml (1.56-7.92) de IL-17A en TARV- vs. DSs $p = 0.048$, Figura 4B; 0.62 pg/ml (0.31-0.90) de IL-10 en TARV- vs. DSs $p = 0.038$, Figura 4C], estas diferencias deben ser interpretadas con cautela debido al bajo número de muestras endocervicales de las cuales fue posible obtener CMCs en este grupo de pacientes hasta el momento (su reclutamiento continúa actualmente). Resulta interesante destacar que, en aquellas pacientes del grupo TARV+ para las cuales se encontraron niveles detectables de producción de IL-17F desde las CMCs, esto se correlacionó positivamente con mayores recuentos de células T CD4+ CD161+ en sangre periférica ($p = 0.0333$ $r = 0.8857$; Figura 4D), aunque por el momento la cantidad de datos disponibles es limitada ($n = 6$).

Los resultados de esta segunda parte del trabajo indican que durante la infección crónica por HIV, la aplicación de tratamiento antirretroviral se asocia con una restauración incompleta de la inmunidad en sitios de mucosas, en contraste a lo observado en sangre periférica.

REFERENCIAS

1. L. E. Harrington et al., *Nat Immunol* 6, 1123 (Nov, 2005).
2. H. Park et al., *Nat Immunol* 6, 1133 (Nov, 2005).
3. S. L. Bixler, J. J. Mattapallil, *Clin Dev Immunol* 2013, 852418 (2013).
4. B. Kanwar, D. Favre, J. M. McCune, *Curr Opin HIV AIDS* 5, 151 (Mar, 2010).
5. D. Li et al., *Clin Exp Immunol* 165, 363 (Sep, 2011).
6. M. F. Chevalier et al., *PLoS Pathog* 9, e1003453 (2013).
7. A. Singh, M. Vajpayee, S. A. Ali, N. K. Chauhan, *J Med Virol* 86, 372 (Mar, 2014).
8. D. Favre et al., *PLoS Pathog* 5, e1000295 (Feb, 2009).

9. A. Kok et al., *Mucosal Immunol* (Jul 2, 2014).
10. L. Brandt et al., *J Acquir Immune Defic Syndr* 57, 101 (Jun 1, 2011).
11. A. Singh, M. Vajpayee, S. A. Ali, N. K. Chauhan, *J Med Virol* 86, 372 (Mar, 2014).
12. F. Cocchi et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5411 (Apr 3, 2012).
13. J. S. Lambert et al., *Pediatr Infect Dis J* 26, 935 (Oct, 2007).
14. M. A. Jenabian et al., *Clin Exp Immunol* (Jun 12, 2014).

ABSTRACT

The first aim of this study was to analyze these T-cell subsets and their relation with clinical parameters during PHI and up to one year post-infection (p.i). Samples from 14 healthy donors (HDs), 40 PHI patients, 17 Chronics, and 13 Elite controllers (ECs) were studied. The percentages of Th17 and Treg subsets were severely altered in Chronics, whereas all HIV-infected individuals (including ECs) showed Th17/Treg imbalance compared to HDs, in concordance with higher frequencies of activated CD8+ T-cells (HLA-DR+/CD38+). Better clinical status (higher CD4+T-cell counts, lower viral loads and immune activation) was associated with higher Th17 and lower Treg levels.

The second aim was to characterize Th17 and Treg subsets and their balance in peripheral blood and female genital tract and their implications in the immunopathogenesis of HIV-1 infection comparing antiretroviral treatment (ART+) with ART- patients. Samples from 19 ART+ infected patients (more than 2 years under treatment), 22 chronically infected ART naïve patients (ART-) and 20 HDs were used. After treatment, both the frequency of Th17 cells as well as Th17/Treg ratio in peripheral blood reached similar levels compared to HDs, in contrast to that observed for Treg cells that remained at high levels despite ART. Importantly, ART did not induce a proper restoration of the CD4+ CD161+T-cell counts (a subset of Th17 precursor cells with GALT homing properties) which were significantly lower compared to HDs. Interestingly, it was observed that cervix mononuclear cells (CMCs) from ART+ subjects secreted lower amounts of IL-17A and IL-10 upon stimulation than those obtained from HDs.

Taken together, these results suggested a link between Th17 and Th17/Treg ratios with disease progression signs. And on the other hand, although ART has a positive impact on immune restoration in blood immune restoration at mucosal sites may be impaired or incomplete.

Key words: Th17/Treg ratio, HIV, acute/early infection, antiviral immunity, female genital tract, antiretroviral treatment.

BIOSEGURIDAD EN LA ATENCIÓN DE SALUD HUMANA. PROTECCIÓN CONTRA LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL AL VIRUS DE LA HEPATITIS B

Susana Fink, Claudia Ferrario
Academia Nacional de Medicina / IIHema.

El virus de la hepatitis B (HBV) causa una enfermedad epidemiológicamente importante prevenible por vacunación. Los trabajadores de la salud (TS) tienen un riesgo de infección con este virus de 3 a 5 veces mayor que la población general, destacando la importancia de conocer el estado inmunológico de estos trabajadores hacia el HBV. La vacuna contra el VHB está basada en el antígeno de superficie del virus (sHBV), recombinante, y protege a una alta proporción de los individuos vacunados. El título de anticuerpos debe ser evaluado de 30 a 60 días después de la tercera dosis. Si el título es $> 10 \text{ mUI/ml (+)}$ se considera protector. Los individuos No respondedores (NR) tienen un título $< 10 \text{ mUI/ml (-)}$ después de dos cursos completos de vacunación (FCV) y representan entre 5 a 10% de la población. Distintos países difieren en requerir o no vacunas de refuerzo. En Argentina, el empleador debe ofrecer la vacuna al TS, esto es obligatorio por ley. Muchos TS no fueron evaluados después de la inmunización, por lo tanto, no son conscientes de su estado de vacunación, ignoran si alguna vez respondieron a la vacuna. Nuestro objetivo fue estudiar la respuesta inmune celular en TS vacunados, a diferentes tiempos después de completar un FCV, con el fin de determinar el estado inmune de los individuos sin títulos de anticuerpos protectores en la actualidad, evitando darles una dosis de refuerzo de la vacuna y posterior valoración de anticuerpos.

Se evaluó el título de anticuerpos Anti- sHBV por ELISA en el suero de 241 TS (188 mujeres, 53 hombres). En las células mononucleares de sangre periférica, estimuladas o no con sHBV durante 48 hs, de algunos de estos TS, se evaluó la proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada, y la expresión de CD69 y la producción intracelular de IFN-gamma por citometría de flujo. Algunos sueros con títulos de anticuerpos bajos fueron evaluados por inmunodifusión radial para descartar una deficiencia general de la producción de anticuerpos.

CONCLUSIONES

En los últimos años, la vacuna contra el VHB se ha incluido en el plan de vacunación pediátrica. Al mismo tiempo, más y más personas lleguen a su edad laboral habiendo sido vacunado con anterioridad, pero sin haber sido evaluada su respuesta. Las pautas de vacunación de nuestro Ministerio de Salud recomiendan la evaluación de anticuerpos después de 4 semanas de la tercera dosis de vacuna anti-HBV para los TS y los individuos inmunocomprometidos, pero no para la población en general. Si su título es <10 mUI / ml deben recibir un nuevo ciclo completo de vacunación y ser evaluados después de esto, lo que lleva un tiempo superior a los 6 meses. Así que si estos TS habían recibido la vacuna antes, y su título de anticuerpos no había sido evaluado, y en la actualidad tienen un título bajo, no saben si son no respondedores o si su título declinó con el tiempo, lo que ocurre con frecuencia, pero todavía están protegidos. Otras directrices proponen dar una dosis de refuerzo de la vacuna y evaluar después de eso. Además, algunos TS reciben un curso completo de vacunación pero no se evalúan en el momento apropiado después. Por lo tanto, todos estos trabajadores ignoran si están protegidos al desarrollar sus tareas profesionales, que son una fuente de posible exposición al HBV.

Hemos demostrado que el estado inmunológico puede ser evaluado mediante ensayos de respuesta inmune celular, tales como el ensayo de proliferación linfocitaria. Las células de los TS con un título de anticuerpos inicial > 10 mUI / ml proliferaron en respuesta al antígeno sHBV, independientemente de su actual título de anticuerpos, mientras que las de las personas definidas como no respondedores no lo hicieron. Se evaluaron otros parámetros celulares con resultados en el mismo sentido. La expresión del marcador de activación CD69 se incrementó en las células de los TS con un título de anticuerpos inicial > 10 mUI / ml cuando se estimulan con el antígeno sHBV, independientemente de su presente título de anticuerpos, mientras que en los de los individuos definidos como no respondedores no lo hizo. Se obtuvieron resultados similares mediante la evaluación de la producción de IFN gamma, aunque las diferencias eran menores. Así, si un trabajador sanitario no sabe si está protegido o no contra el HBV, y tiene un título de anticuerpos <10 mUI / ml, se puede evitar el suministro de dosis de refuerzo o un ciclo completo de la vacuna mediante la evaluación de estos parámetros celulares. Los resultados pueden ser obtenidos en tiempos más cortos; por lo tanto, estos métodos pueden ser usados como o métodos

complementarios o alternativos de evaluación de la respuesta inmune a la vacuna contra el HBV.

ABSTRACT

Viral B hepatitis is an important epidemiological disease preventable by vaccination. Health care workers (HCW) have a risk of infection with this virus 3 to 5 times higher than the general population, highlighting the importance of knowing their immunological status towards HBV.

The HBV vaccine based on the recombinant surface virus antigen (sHBV) protects a high proportion of vaccinated individuals. Antibody (Ab) titers are tested 30-60 days after the third dose. A titer >10 mUI/mL is protective. Non-responders (NR) have <10 mUI/mL after two full courses of vaccination (FCV). Many HCW were never evaluated after immunization. They ignore if they ever responded to the vaccine.

Our objective was to study the cellular immune response in vaccinated HCW at different times after completing a FCV, to determine the immune status of those individuals without protective Ab titers at present, avoiding a booster dose of the vaccine and subsequent antibody titration.

We demonstrated that the immunological status can be evaluated by cellular assays. Cells from those HCW with an initial antibody titer >10 mUI/ml proliferated in response to the sHBV antigen, regardless of their present Ab titer, while those from individuals defined as non-responders did not.

Expression of the activation marker CD69 and production of IFN gamma were increased in cells from HCW with an initial antibody titer >10 mUI/ml when stimulated with the sHBV antigen, regardless of their present Ab titer, while in those from non-responders it did not.

So, if a HCW with an antibody titer <10 mUI/ml wonders if he is protected or not against HBV, booster doses or a full course of the vaccine may be avoided by evaluating cellular parameters. Results can be obtained in shorter times; hence these methods provide alternative or complementary means of evaluation of the immune response to the HBV vaccine.

BASES MOLECULARES DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS QUE AFECTAN LA SÍNTESIS DE BETA-GLOBINA. ESTUDIO EN LA PROVINCIA DE TUCUMÁN

Mónaco, ME; Lazarte, S; Haro, AC; Ledesma Achem, E; Jimenez, C
e Issé, BA

Instituto de Bioquímica Aplicada-Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia-
Universidad Nacional de Tucumán

INTRODUCCIÓN

Los síndromes talasémicos son un grupo de enfermedades hereditarias con un patrón de transmisión autosómico recesivo debidas a deficiencias en la síntesis de una o más cadenas de polipéptidos de la hemoglobina (Hb), que dan lugar a diversos grados de anemia crónica; Higgs et al. (2001).

La talasemia más frecuente en nuestro entorno es la β -talasemia, en la que debido a la disminución o ausencia del número de cadenas beta, se produce un exceso relativo de cadenas alfa que precipitan a nivel del citoplasma de los eritroblastos e impiden su maduración a hematíes (hematopoyesis ineficaz), siendo este el mecanismo fisiopatológico de la anemia en esta patología. Asimismo, la disminución de la concentración normal de la HbA durante su síntesis eritroblástica, se acompaña de un aumento compensador de otras fracciones hemoglobínicas (Hb A₂). Se presenta principalmente en personas de origen mediterráneo, donde el 5-10% de la población es heterocigota para el defecto, y también en individuos de origen asiático o africano (3,4% en Hong-Kong y 3-9% en Tailandia) Lau et al. (1997), Fucharoen et al. (1987).

Las alteraciones hereditarias de la Hb representan un problema de salud pública en diferentes áreas geográficas repartidas por todo el mundo. En la mayoría de las ocasiones el estado de portador cursa de forma silente o asintomática, pero su forma homocigota o doble heterocigota puede causar una enfermedad grave.

La población argentina, hasta el siglo diecinueve, estaba compuesta principalmente por individuos de origen español, aborígenes y mestizos, siendo la colonización española la principal responsable de la introducción de los genes β -talasémicos en nuestro país. Sin embargo, el arribo de dos importantes olas de inmigración provenientes de la Cuenca del Mediterráneo, particularmente de España e Italia durante los años 1876-1925 y 1947-1951;

Nascimbene (1980), sumado a una corriente inmigratoria de origen árabe entre 1895-1914, que se situó en el Noroeste de Argentina, profundizó la presencia de la β -talasemia en nuestro país; Asfoura (2004).

Desde el punto de vista molecular, las talasemias obedecen a mutaciones en los genes de globina que alteran el mecanismo de síntesis proteica. Existen dos formas moleculares de β -talasemia: β^+ talasemia en la que se puede apreciar una pequeña cantidad de cadenas β globina y β^0 talasemia, en las que éstas son indetectables. Se han descrito hasta el presente más de 200 mutaciones que afectan el gen de la globina capaces de producir fenotipos de talasemia y muchas de ellas exclusivas de algunas regiones geográficas. En la β -talasemia, los tipos de mutaciones predominantes son las sustituciones de nucleótidos intrónicos de la zona de contacto introexónica o exónicos, que alteran la transcripción o maduración del ARN mensajero (ARNm) e impiden la traducción de la molécula de globina; Galanello y Origa (2010).

La β -talasemia mayor se produce cuando ambos miembros de la pareja son portadores de este desorden. El tratamiento de la β -talasemia mayor es de por vida, costoso y la única cura disponible hoy en día es el trasplante de médula ósea. El nacimiento de un niño con β -talasemia mayor, no solo afecta al niño y a su familia, sino también a toda la comunidad. Por ello es importante prevenir tales nacimientos en el futuro conociendo si una persona es portadora de talasemia; OMS (2006). En la actualidad, nuestro país no dispone de un registro nacional oficial de las hemoglobinopatías, entre ellas la β -talasemia, ni en niños ni en adultos. Más aún, en la región del noroeste argentino se desconoce el espectro de mutaciones en los genes de beta globina presentes en dichos pacientes.

La distribución mundial de los alelos de β talasemia no es al azar, cada grupo étnico porta su propio repertorio particular de alelos β -talasémicos, incluyendo un pequeño número de mutaciones frecuentes las cuales corresponden al 85-99% de todos los casos en dicha población. El conocimiento de la frecuencia y distribución de los alelos β -talasémicos que afectan a un determinado grupo étnico, facilita la detección molecular y también un consejo genético apropiado; Kazazian y Boehm (1988).

El aumento progresivo de la inmigración, en los últimos años, desde países con altas tasas de hemoglobinopatías estructurales y síndromes talasémicos hacia la comunidad de Tucumán, justifica su estudio ya que el grupo étnico de la región del noroeste argentino no ha sido investigado previamente a nivel molecular.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los defectos moleculares, establecer su frecuencia y estudiar la relación genotipo-fenotipo hematológico en portadores de β -talasemia en la Provincia de Tucumán, Argentina.

METODOLOGÍA DE TRABAJO

Muestras estudiadas

Se analizaron 71 individuos (rango etario de 1 a 76 años) residentes en la provincia de Tucumán desde setiembre 2011 hasta diciembre 2013, que asistieron al Instituto de Bioquímica Clínica Aplicada de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la UNT, de la Ciudad de San Miguel de Tucumán, y que cumplieron con los criterios hematológicos del rasgo β -talasémico: VCM y HCM, disminuidos ($VCM < 78$ fl y $HCM < 27$ pg), y $HbA_2 > 3,5\%$ con exclusión de déficit de hierro. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado aprobado por el Consejo de Bioética del Sistema Provincial de Salud de Tucumán. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 17.0.

Estudios hematológicos

- Hemograma, con contador hematológico (SYSMEX KX-21N), incluyó los siguientes parámetros: recuento de leucocitos (GB), recuento de eritrocitos (GR), dosaje de Hb, hematocrito (Hto), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y recuento de plaquetas (PLAQ).
- Perfil de hierro: ferremia (método colórimétrico, Wiener lab), capacidad total de unión de hierro a transferrina (CTUT - Wiener lab) y porcentaje de saturación de transferrina.
- Estudio del rasgo β -talasémico: electroforesis de Hb a pH alcalino en acetato de celulosa, y determinación de la concentración de Hb A_2 (cromatografía de intercambio iónico).

Detección de las mutaciones

La caracterización de las mutaciones presentes se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR). El aislamiento del ADN genómico se realizó con el kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) a partir de 200 μ l de sangre entera anti-coagulada con EDTA.

Los cebadores utilizados amplifican una región de 587 pb del gen de la β -globina: Primer Forward: 5'-gct gtc atc act tag acctca-3' y Primer Reverse, 5'-cac agt gca gct cac tca g-3'. Se utilizaron dos combinaciones de sondas de hibridación, para detectar las mutaciones más frecuentes en Argentina, Rossetti et al. (2004), marcadas con diferentes fluoróforos de acuerdo al siguiente esquema:

SET A

Mutaciones: IVSI-1G→A; IVSI-5G→A; IVSI-6T→C

Sondas de hibridación: aceptor, IVSI-1.5.6 (TYE 705-5'-tgt aac ctt gat acc aac ctg ccc a-3'-fosfato) Temperatura de *melting* (Tm) 63,2°C; dador: IVSI-1.5.6 (5'-tgc cca gtt tct att ggt ctc ctt aaa cct gtc-3'-FITC) Tm 68,4°C.

SET B

Mutaciones: IVSI-110G→A; Cd39C→T

Sondas de hibridación: aceptor, IVSI 110 (5'-tct gcc tat tgg tct att ttc cc-3'-LC Red 640) Tm 56,6°C; aceptor Cd39 (TYE 705-5'-acc ctt gga ccc aga ggt tct t-3'-fosfato) Tm 56,0°C; dador IVSI-110/Cd39 (FITC-5'-ccc tta ggc tgc tgg tgg tc-3'-FITC) Tm 61,6°C.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en tubos capilares (Roche) en un volumen final de 20 μ l conteniendo 0,5 μ M de cada primer, 0,15 μ M de cada sonda fluorescente y 2 μ l de DNA. El perfil de ciclado fue el siguiente: activación de la enzima y desnaturalización de la muestra, 94°C por 8 min; seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C 3 segundos; *annealing* a 58°C 5 segundos y extensión a 72°C 20 segundos; Vrettou et al. (2003). Durante la qPCR la fluorescencia emitida se midió al finalizar la etapa de *annealing* de cada ciclo de amplificación.

Análisis de la temperatura de *melting*: las muestras se calentaron desde 45°C hasta 90°C a una velocidad de 0,2 °C/segundo, y se midió la fluorescencia de manera continua (en ambos canales: 640 nm y 705 nm) y los resultados se analizaron graficando fluorescencia en función de la temperatura con el software asociado al equipo LightCycler 2.0. de manera que los picos de Tm resultantes permitieron la diferenciación entre los alelos salvajes y los alelos mutados del gen de la β -globina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de las mutaciones

Los resultados obtenidos en el análisis de los 71 portadores del rasgo β talasémico, pertenecientes a 49 familias, se pueden observar en la tabla 1. Las 3 mutaciones más frecuentes fueron las mutaciones CD-39C→T, IVS-I-1G→A, e IVS-I-110G→A. En todos los casos la mutación se presentó en heterocigosis.

Tabla 1. Mutaciones β -talasémicas detectadas en la provincia de Tucumán, Argentina

MUTACIÓN	FENOTIPO	FAMILIAS	PACIENTES	ALELOS
CODON 39 (C→T)	β^0	22 (45.0%)	31	22
IVS-I-110 (G→A)	β^+	8 (16.3%)	10	8
IVS-I-1 (G→A)	β^0	11 (22.5%)	15	11
IVS-I-1 (G→T)	β^0	1 (2.0%)	2	1
IVS-II-1 (G→A)	β^0	2 (4.1%)	4	2
IVS-I-6 (T→C)	β^{++}	1 (2.0%)	2	1
IVS-II-745 (C→G)	β^+	1 (2.0%)	1	1
DESCONOCIDA	--	3 (6.1%)	6	--
TOTAL	--	49	71	46

Actualmente, hay descritas 239 variantes β -talasémicas en el gen que codifica para la globina beta, informadas en la base de datos de mutaciones Hb Var database, éstas determinan la disminución parcial de la síntesis de β -globina (mutaciones β^+) y/o su supresión (mutaciones β^0); Patrinos et al. (2005).

El espectro de mutaciones difiere entre los grupos étnicos de cada población, existiendo un número reducido de mutaciones productoras de la mayoría de los alelos β -talasémicos y un número variable de mutaciones esporádicas. Nuestros resultados fueron parcialmente similares a los descriptos por Rosetti et al. (2004) quienes informaron las siguientes mutaciones alélicas más frecuentes en la República Argentina: CD-39 (39.45%), IVS-I-110 (23.85%), IVS-I-1: (13.76%), IVS-I-6 (7.34%), IVS-II-1 (3.68%) e IVS-II-745 (1.83%) en 254 familias con un total de 475 pacientes. En un estudio realizado en Rosario, Argentina, entre los años 1996-1998, en un total de

72 pacientes con β -talasemia heterocigotos, se informó que la frecuencia de las mutaciones evaluadas fue también similar a la encontrada en la zona del Mediterráneo coincidiendo con la inmigración europea a nuestro país; Bragós et al. (2000).

Las diferencias encontradas con nuestros resultados podrían deberse a una mayor influencia de la inmigración española en el norte argentino que en las provincias de Córdoba, Buenos Aires y Santa Fe; Asfoura (2004).

3.2 Estudio de la relación genotipo-fenotipo hematológico

La asociación de cada mutación estudiada con los parámetros hematológicos se muestra en la Tabla 1. Los portadores del rasgo β -talasémico, con respecto a la población normal, tienen una alteración en los índices eritrocitarios relacionados con el número, tamaño de los hematíes (VCM) y la hemoglobina corpuscular media (HCM). En los portadores estas magnitudes están disminuidas y hay un aumento en el número de hematíes.

Tabla 2. Parámetros hematológicos agrupados en función de las distintas mutaciones estudiadas (media $\pm$ desviación estándar)

	CD39 (n= 31)	IVS-I-1 (n= 17)	IVS-I-110 (n= 10)	IVS-II-1 (n= 4)	IVS-I-6 (n= 2)	IVS-II-745† (n= 1)	ND (n= 6)
VCM [fL]	64,3 $\pm$ 2,9	64,3 $\pm$ 4,6	64,9 $\pm$ 1,9	63,4 $\pm$ 2,5	62,8 $\pm$ 0,6	67,4	71,1 $\pm$ 6,8*
HCM [pg]	19,1 $\pm$ 0,9	19,0 $\pm$ 1,5	19,3 $\pm$ 0,7	18,6 $\pm$ 0,7	18,4 $\pm$ 0,1	19,8	21,5 $\pm$ 2,7*
HbA ₂ [%]	5,1 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 0,6	5,1 $\pm$ 0,7	5,7 $\pm$ 1,0	5,2 $\pm$ 0,2	5,1	5,1 $\pm$ 0,6
HIERRO [μ g/dL]	99 $\pm$ 50	101 $\pm$ 43	104 $\pm$ 37	99 $\pm$ 17	64 $\pm$ 2	81	91 $\pm$ 30

*p < 0,05 entre el grupo ND y los grupos CD39, IVS-I-1 e IVS-I-110.

† IVSII-745 fue excluido del análisis comparativo por ser un caso único.

ABREVIATURAS: ND, no detectado; VCM, volumen corpuscular medio; HCM, Hb corpuscular media; RDW (red distribution width), amplitud de distribución eritrocitaria.

Nuestros resultados muestran que solamente en los pacientes con una mutación desconocida se presenta una diferencia significativa (p < 0,05) en el VCM y HCM con respecto a los grupos correspondientes a las mutaciones más frecuentes (CD39, IVS-I-1 e IVS-I-110). No se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el resto de los parámetros estudiados para ninguna de las mutaciones (Tabla 2).

El perfil hematológico obtenido en los individuos estudiados fue semejante al informado por Aixelá (2003) en un estudio sobre 518 pacientes portadores de β -talasemia menor realizado en la provincia de Buenos Aires y por

Lazarte et al. (2007) en nuestra provincia. Por otro lado, Bragós et al. (2005) hallaron diferencias levemente significativas ($p < 0,10$) entre los valores promedio de HCM para las distintas mutaciones consideradas en un estudio de 99 portadores de β -talasemia no relacionados de Rosario, provincia de Santa Fe. Estos investigadores encontraron que para el genotipo IVS-I-6 (β^+) los valores de HCM eran levemente superiores que para el genotipo IVS-II-745 (β^+). El escaso número de portadores de estas mutaciones impide el análisis comparativo en el trabajo actual.

CONCLUSIONES

En el grupo de pacientes analizados se observó que la mutación CD-39 (β^0) fue la más frecuente pero no se pudo establecer una relación significativa entre los distintos genotipos estudiados y los fenotipos hematológicos correspondientes. El presente trabajo constituye el primer estudio molecular de la β -talasemia en la región del noroeste argentino, siendo el único grupo de trabajo que utiliza la técnica de PCR tiempo real en la Argentina para diagnóstico molecular de los síndromes talasémicos. Los resultados obtenidos hasta el presente y la ampliación de los mismos en el futuro, permitirán sentar las bases para la elaboración de un Registro Provincial/Nacional de Hemoglobinopatías y brindar un asesoramiento genético adecuado.

REFERENCIAS

1. Aixalá M. Prevalencia y perfil hematimétrico de β -talasemia menor. **Hematología**, v.7, p.183-186, 2003.
2. Asfoura OL. Arabes en Tucumán: Relatos de Abuelas. *Amérique Latine Histoire et Mémoire. Les Cahiers ALHIM*. Disponible en: <<http://alhim.revues.org/index395>>. Acceso en: 2004
3. Bragós IM, Noguera NI, Morisoli L, Milani AC. Most frequent mutations of β -thalassemia in Rosario, Argentina. **Haematologica**, v.85, p.101-102, 2000.
4. Bragós IM, Noguera NI, Raviola P, Milani AC. Genética molecular de beta talasémicos heterocigotas. Interrelación con parámetros hematológicos. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia** v.21, p.1-11, 2005.
5. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. **Hemoglobin** v.11, p. 65-88, 1987;
6. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. **Orphanet Journal of Rare Disease**, v. 5, p.11-25, 2010

7. Higgs DR, Thein SL, Woods WG. **The molecular pathology of the thalassaemias**. Weathherall DJ Clegg B, eds. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Oxford, England: Blackwell Science 2001; p.133-191.
8. Kazazian H, Boehm C. Molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia. **Blood**, v.72, p.1107-1116, 1988.
9. Lau YL, Chan LC, Chan YY, Ha SY, Yeunq CY, Waye JS, *et al*. Prevalence and genotypes of α and β -thalassemia carriers in Hong-Kong: implications for population screening. **New England Journal of Medicine**, v.336, p.1298-301, 1997.
10. Lazarte S, Leri GM, Agüero G, Issé B. Perfil hematológico de la β -talasemia menor en Tucumán. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.41, p. 219-23, 2007.
11. Nascimbene M (ed). Los inmigrantes italianos en la Argentina: sus lugares de origen, sus lugares de destino, Buenos Aires: Fundación Giovanni Agnelli de Tucumán, 1980.
12. OMS. Organización Mundial de la Salud. Talasemias y otras hemoglobinopatías. Disponible en: <apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB118/B118_5-sp.pdf>. Acceso en: 2006
13. Patrinos GP, Kollia P, Papadakis MN. Molecular diagnosis of inherited disorders: lessons from hemoglobinopathies. **Human Mutation**, v.26, p. 399- 412, 2005.
14. Rossetti L, Targovnik H, Varela V. The molecular basis of β -thalassemia in Argentina. Influence of the pattern of immigration from the Mediterranean Basin. **Hematologica** , v.89, p.746-747, 2004.
15. Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Malamis G, Kanavakis E. Rapid screening of multiple beta-globin gene mutations by real-time PCR on the Light-Cycler: application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes. **Clinical Chemistry**, v.49, p.769-776, 2003.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DE LOS PROCESOS DE PROLIFERACIÓN, SOBREVIVENCIA Y MIGRACIÓN, ESPECIALMENTE A HUESO, DE LA CÉLULA TUMORAL MAMARIA HUMANA. PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.”

Labovsky V.¹, Martínez L.¹, Matas A.¹, Calcagno ML.², Davies KM.³,
García-Rivello H. ³, Wernicke A.³, Chasseing NA.¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina. ²
Departamento de Estadística para Ciencias de la Salud, Cátedra de Bioestadística,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires, Argentina y
³Departamento de Patología, Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La formación de un tumor clínicamente relevante depende de las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM) y de la composición y función del microambiente tumoral (MT), en particular las células estromales (CE) fusiformes no asociadas a la vasculatura (Figura 1).

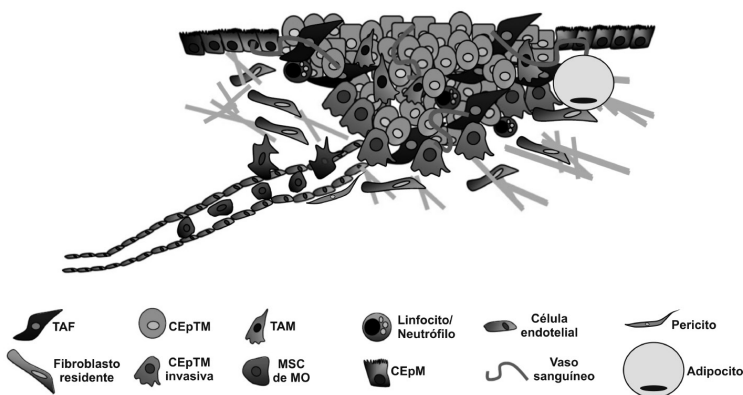


Figura 1. Principales componentes del microambiente tumoral mamario. TAF= fibroblasto asociado al tumor, CEpTM= célula epitelial tumoral mamaria, TAM= macrófago asociado al tumor, MSC= célula madre mesenquimal, MO= médula ósea, CEpM= célula epitelial mamaria. Figura adaptada de Biochim Biophys Acta 2013; 1836:321-335.

Simulando a las heridas, los tumores atraen a las células madre mesenquimales (MSC) de médula ósea (MO) donde la mayor parte de ellas se diferencian en fibroblastos asociados al tumor (TAF). Las MSC pueden migrar al tumor de mama en los estadios iniciales de la enfermedad por algunos de los factores que se detallan en la Figura 2 y allí liberan factores que favorecen la proliferación y supervivencia de la CEpTM, la capacidad de transdiferenciación epitelial mesenquimal (EMT) de las CEpTM induciendo así la hormono independencia, la auto-renovación de las células madre tumorales (TSC) o células durmientes. Además, las MSC en el microambiente tumoral también favorecen la evolución del cáncer por su capacidad de inmunosupresión y por su capacidad de transdiferenciación mesenquimal-epitelial (MET) pudiendo dar lugar a TSC o células epiteliales tumorales⁽¹⁻⁴⁾ (Figura 2). Es decir, existe una interacción permanente entre las MSC de MO que llegan al tumor y las CEpTM, jugando este diálogo un papel crítico en los procesos de proliferación, supervivencia, migración y metástasis de la CEpTM, así como en el proceso de angiogénesis e inmunosupresión. Y viceversa, las MSC presentes en la MO atraen células tumorales contribuyendo a un microambiente que promueve la osteólisis, supervivencia, proliferación y resistencia a la terapia adyuvante^(2,5-15).

Por otra parte, dado que los “factores de pronóstico clásicos” (tipo de tumor, edad, tamaño, grado histológico, receptores hormonales (ER y PR) y Her2/neu, así como el estado de los ganglios linfáticos regionales)^(8,16-18), aplicados actualmente no siempre predicen adecuadamente la evolución clínica-patológica de las pacientes con cáncer de mama (PCM)⁽⁹⁾, nos resultó interesante plantearnos como OBJETIVO GENERAL: identificar nuevos “parámetros de pronóstico no clásicos” (ligandos y receptores) en las CEpTM y CE que permitan no sólo predecir el futuro comportamiento del tumor primario sino también el desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas en las PCM temprano.

Estos parámetros no clásicos son: α -SMA, FSP, CD105 y CD146 sólo en las CE y OPG, TRAIL, receptores de TRAIL (TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 y TRAIL-R4), RANKL, RANK (receptor de RANKL), SDF-1, CXCR-4 (receptor de SDF-1), IL-6, IL-6-R (receptor de IL-6), M-CSF, CD115 (receptor de M-CSF), CCL-2 y CCR-2 (receptor de CCL-2) en las CEpTM y CE.

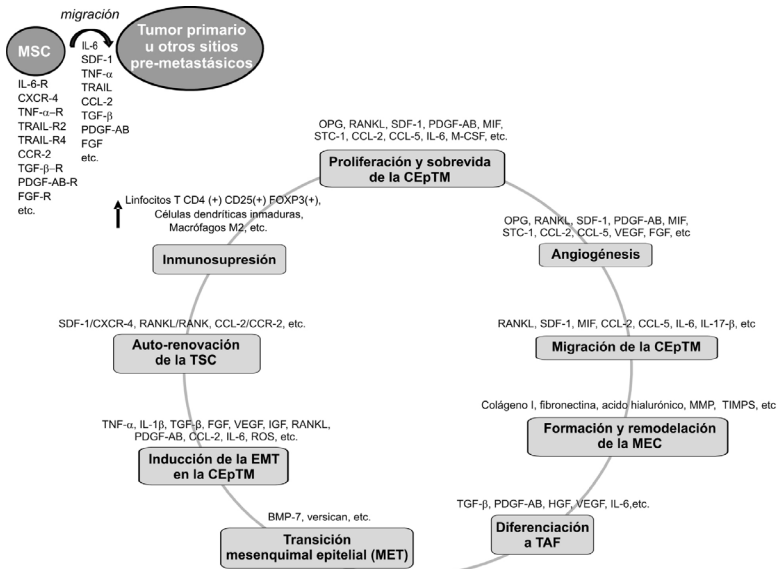


Figura 2. Contribución de las células madre mesenquimales (MSC) de médula ósea a la progresión del tumor mamario. Las MSC de médula ósea al migrar al tumor primario de mama en los estadios iniciales de la enfermedad poseen la capacidad de: i) favorecer la proliferación, supervivencia y migración de la célula epitelial tumoral mamaria (CEpTM), la angiogenesis, así como regular la formación y remodelación de la matriz extracelular (MEC); ii) diferenciarse a fibroblastos asociados al tumor (TAF); iii) adquirir un fenotipo más epitelial [transición mesenquimal epitelial (MET)]; iv) inducir la hormona independencia de las CEpTM al favorecer en estas últimas un fenotipo mesenquimal [transición epitelial mesenquimal (EMT)]; v) favorecer la auto-renovación de las células madre tumorales (TSC); y vi) inmunosupresión. OPG= osteoprotegerina, RANKL= ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa β, SDF-1= factor derivado de células estromales-1, PDGF-AB= factor de crecimiento derivado de plaquetas-AB, MIF= factor inhibitorio de la migración de macrófagos, STC-1= estaniocalcina-1, CCL-2= ligando de la quimoquina CC-2, CCL-5= ligando de la quimoquina CC-5, IL-6= interleuquina-6, M-CSF= factor estimulante de colonias-monocíticas/macrófagos, VEGF= factor de crecimiento endotelial vascular, FGF= factor de crecimiento fibroblástico, MMP= metaloproteasas, TIMPS= inhibidor tisular de metaloproteasas, TGF-β= factor de crecimiento transformante-β, HGF= factor de crecimiento hepático, BMP-7= proteína morfogénica de hueso-7, TNF-α= factor de necrosis tumoral-α, IGF= factor de crecimiento insulínico, ROS= especies oxigenadas reactivas, TRAIL= ligando inductor de la apoptosis relacionado al TNF, R= receptor, CXCR-4= R de quimoquinas CXC-4, RANK= R activador para el factor nuclear kappa β, CCR-2= R de la quimoquina CC-2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 63 PCM (rango de edad entre 42 y 79 años), ductal infiltrante, estadio I/II, libres de tratamiento y con un seguimiento clínico de 10 años desde la cirugía y tejidos mamarios no neoplásicos provenientes de 10 mujeres (rango de edad entre 40 y 75 años). Las muestras de tejido se obtuvieron según se describe en el trabajo Labovsky y colaboradores⁽¹⁹⁾.

Este trabajo se desarrolló bajo los principios de la Declaración de Helsinki. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de IBYME y el Comité de Ética de Protocolos de Investigación del Hospital Italiano. Dichas aprobaciones también incluyen la de los consentimientos informados.

El estudio de la expresión de α -SMA, FSP, CD105, CD146, OPG, TRAIL, TRAIL-R1-4, RANKL, RANK, SDF-1, CXCR-4, IL-6, IL-6-R, M-CSF, CD115 (receptor de M-CSF), CCL-2 y CCR-2 en las CE y/o en las células epiteliales mamarias de tejido tumoral y no neoplásico se realizó por la metodología de inmunocitoquímica (IHQ) según se detalla por Labovsky y colaboradores⁽¹⁹⁾. Los anticuerpos (Ac) primarios y controles de isotipo usados se detallan en la Tabla 1. Cada muestra se hizo por duplicado.

Los datos clínico-patológicos “parámetros de pronóstico clásicos” fueron categorizados según Wernicke y colaboradores⁽²⁰⁾ y Bloom⁽²¹⁾. En la Tabla 2 se detalla la distribución (n y porcentaje) de las PCM incluidas en nuestra cohorte retrospectiva según los datos de cada uno de los parámetros de pronóstico clásicos.

También incluimos otros datos clínico-patológicos como el número de PCM que desarrollaron: metástasis, primera evidencia de metástasis ósea (MTsO), primera evidencia de metástasis en vísceras/ganglios linfáticos no regionales y recidiva local (recidiva en la misma región de la mama) (Tabla 1). Además, incluimos el tiempo transcurrido post-cirugía libre de: enfermedad, recurrencia metastásica, MTsO, metástasis en vísceras/ganglios linfáticos no regionales, recidiva local y sobrevida post-cirugía.

El criterio de lectura de las muestras fue establecido con los patólogos del Hospital Italiano, con quienes acordamos utilizar un sistema de Score (distribución/intensidad)⁽¹⁹⁾.

Análisis estadístico

Se realizaron los siguientes test estadísticos: Mann Whitney, Spearman, Kaplan-Meier y análisis multivariado [Cox Proportional Hazards Model, Backward Stepwise (Likelihood Ratio)].

Se consideró significativa toda $p < 0,05$ (dos colas). Se utilizaron los programas SPSS (versión 18,00, Chicago, Illinois) e InfoStat (versión 2012, InfoStat Group, Universidad de Córdoba).

Tabla 1. Detalle de los anticuerpos (Ac) y controles usados en los distintos protocolos. Se indican las características, concentraciones y/o diluciones usadas según el protocolo y los números de catálogo y fabricante de cada uno de los Ac y controles usados y explicados en la sección de "Materiales y Métodos". ICQ= inmunocitoquímica, IHQ= inmunohistoquímica, Ig= inmunoglobulina/s.

Controles y Ac anti-	Especificidad	Tipo de Ig	Aplicación y concentración usada	Fabricante y catálogo
Control de IgG2a de ratón	-----	IgG2a, ratón	Control negativo para ICQ e IHQ (concentración equivalente al primer Ac)	Dako (X0943)
Control de IgM de ratón	-----	IgM, ratón	Control negativo para ICQ e IHQ (concentración equivalente al primer Ac)	Dako (X0942)
Control de IgG de cabra	-----	IgG totales, cabra	Control negativo para ICQ e IHQ (concentración equivalente al primer Ac)	R&D Systems (AB-108-C)
Control de IgG₁ de ratón	-----	IgG ₁ , ratón	Control negativo para IHQ (concentración equivalente al primer Ac)	R&D Systems (MAB002)
Control de Ig de ratón	-----	IgG/IgM totales, ratón	Control negativo para IHQ (listo para usar)	Zymed (08-6599)
Control de Ig de conejo	-----	Ig totales, conejo	Control negativo para IHQ (concentración equivalente al primer Ac)	Dako (X0936)
Control de IgG₁ de rata	-----	IgG ₁ , de rata	Control negativo para IHQ (concentración equivalente al primer Ac)	R&D Systems (MAB005)
α-SMA	Humano	IgG _{2b} , ratón	ICQ e IHQ (1,25 ug/ml)	R&D Systems (MAB1420)
FSP	Humano	IgM, ratón	ICQ e IHQ (2 ug/ml)	Sigma-Aldrich (F4771)
CD105	Humano	IgG, cabra	ICQ e IHQ (5 ug/ml)	R&D Systems (AF1097)
CD146	Humano	IgG, cabra	ICQ e IHQ (5 ug/ml)	R&D Systems (AF932)
OPG	Humano	IgG, cabra	IHQ (15 ug/ml)	R&D Systems (AF805)
TRAIL	Humano	IgG ₁ , ratón	IHQ (25 ug/ml)	R&D Systems (MAB687)
TRAIL-R1	Humano	IgG, cabra	IHQ (10 ug/ml)	R&D Systems (AF347)
TRAIL-R2	Humano	IgG _{2b} , ratón	IHQ (25 ug/ml)	R&D Systems (MAB6311)
TRAIL-R3	Humano	IgG ₁ , ratón	IHQ (25 ug/ml)	R&D Systems (MAB6301)
TRAIL-R4	Humano	IgG, cabra	IHQ (10 ug/ml)	R&D Systems (AF633)
RANKL	Humano	IgG _{2b} , ratón	IHQ (25 ug/ml)	R&D Systems (MAB626)
RANK	Humano	IgG ₁ , ratón	IHQ (25 ug/ml)	R&D Systems (MAB683)
IL-6	Humano	IgG _{2b} , ratón	IHQ (25 ug/ml)	R&D Systems (MAB2061)
IL-6-R	Humano	IgG ₁ , ratón	IHQ (16 ug/ml)	R&D Systems (MAB2271)
SDF-1	Humano	IgG ₁ , ratón	IHQ (8 ug/ml)	R&D Systems (MAB350)
CXCR-4	Humano	IgG _{2b} , ratón	IHQ (7,5 ug/ml)	R&D Systems (MAB172)

Controles y Ac anti-	Especificidad	Tipo de Ig	Aplicación y concentración usada	Fabricante y catálogo
M-CSF	Humano	Ig, conejo	IHQ (0,5 ug/ml)	Abcam (ab9693)
CD115	Humano	IgG ₁ , rata	IHQ (8 ug/ml)	eBioscience (141159)
CCL-2	Humano	IgG _{2b} , ratón	IHQ (16 ug/ml)	R&D Systems (MAB2791)
CCR-2	Humano	IgG, cabra	IHQ (6,66 ug/ml)	Abcam (ab1668)
Citoqueratina AE1-AE3	Humano	IgG ₁ , ratón	IHQ (listo para usar)	Dako (R053)
Secundario biotinilado anti-Ig rata	Rata	IgG, cabra	IHQ (2 ug/ml)	Abcam (ab97055)
Secundario biotinilado anti-IgG ratón	Ratón	IgG, caballo	IHQ (10 ug/ml)	Vector (BA-2000)

Tabla 2. Detalle de las características clínico-patológicas de las 63 pacientes con cáncer de mama (estadios clínico-patológicos I y II) incluidas en nuestra cohorte retrospectiva. ER: receptor de estrógeno y PR: receptor de progesterona.

Características	Pacientes (n)	Pacientes (%)
Edad (años)		
< 50	9	14,29
≥ 50	48	76,19
Desconocido	6	9,52
Tamaño tumoral (cm)		
<2	45	71,43
≥ 2	17	26,98
Desconocido	1	1,59
Grado histológico		
G1	15	23,81
G2	22	34,92
G3	24	38,10
Desconocido	2	3,17
HER2/neu		
Negativo	39	61,90
Positivo	23	36,51
Desconocido	1	1,59
ER		
Negativo	15	23,81
Positivo	47	74,60
Desconocido	1	1,59
PR		
Negativo	14	22,22
Positivo	48	76,19
Desconocido	1	1,59
Nódulos linfáticos regionales		
Negativo	44	69,84

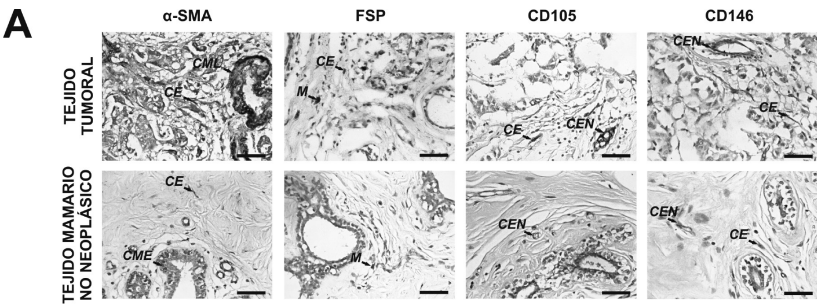
Características	Pacientes (n)	Pacientes (%)
Edad (años)		
Positivo	16	25,40
Desconocido	3	4,76
Recurrencia metastásica		

RESULTADOS

Estudio de la expresión de los “parámetros de pronóstico no clásicos”
Encontramos que la expresión de α -SMA en las CE, del tejido mamario tumoral fue significativamente mayor que en el tejido mamario no neoplásico ($p=0,0001$) (Tabla 3 y Figura 3. A).

Marcadores	Tejido tumoral mamario	Tejido mamario no neoplásico	p
α -SMA	6 (5-7); n=54	4 (0-4); n=9	0,0001
FSP	2 (0-3); n=53	Negativo; n=8	NA
CD105	2 (0-3); n=52	Negativo; n=6	NA
CD146	0 (0-2); n=56	1 (0-2); n=10	0,9596

Tabla 3. Expresión de actina del músculo liso tipo α (α -SMA), proteína específica del fibroblasto (FSP), CD105 y CD146 en las células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura, en las muestras de tejido tumoral de las pacientes con cáncer de mama y en las muestras de tejido mamario no neoplásico por inmunohistoquímica. Los valores se expresan en score final [mediana (rango intercuartilo)]. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test de Mann Whitney. NA= no aplica.



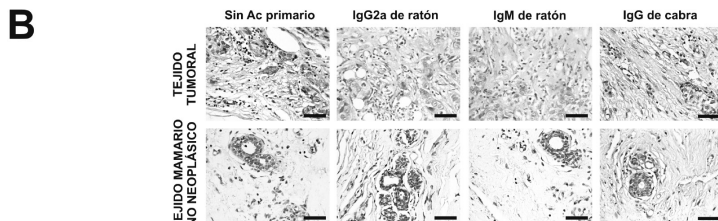


Figura 3. A. Ejemplificación representativa de la expresión de actina del músculo liso tipo α (α -SMA), proteína específica del fibroblasto (FSP), CD105 y CD146 en las células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura, en las muestras de tejido tumoral de las pacientes con cáncer de mama y en las muestras de tejido mamario no neoplásico por inmunohistoquímica. Las flechas indican immuno-reacción positiva en las células estromales (CE) evaluadas, así como en células del músculo liso de los vasos (CML), células mioepiteliales (CME), macrófagos (M) y células endoteliales (CEN) utilizadas como controles positivos internos según describimos anteriormente. **B.** Además, se incubaron ambos tipos de tejidos sin anticuerpo (Ac) primario, con inmunoglobulinas (Ig)G2a de ratón, IgM de ratón o IgG de cabra como controles negativos. Visualización en microscopio óptico (400X). Las barras de escala representan 50 μ m. Tinción: Peroxidasa-DAB/Hematoxilina.

Expresión de OPG, TRAIL, TRAIL-R1-4, RANKL, RANK, SDF-1, CXCR-4, IL-6, IL-6-R, M-CSF, CD115, CCL-2 y CCR-2 en las muestras de tejido tumoral y no neoplásico

Por otro lado, la expresión de OPG, TRAIL, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANKL, RANK, SDF-1, CXCR-4, IL-6, IL-6-R, CCL-2 y CCR-2 en las CEpM fue significativamente mayor que aquella encontrada en las CEpM del tejido no neoplásico (Tabla 4 y Figura 4. A).

Ligandos y receptores	CEpTM	CEpM del tejido no neoplásico	p
OPG	6 (4-6); n=61	3 (0-4); n=10	0,0004
TRAIL	6 (5-6); n=59	4,5 (0-5); n=10	0,0233
TRAIL-R1	4 (0-5); n=60	Negativo; n=10	NA
TRAIL-R2	5 (3-6); n=61	Negativo; n=10	NA
TRAIL-R3	5 (3-6); n=63	2,5 (0-5); n=10	0,0194
TRAIL-R4	6 (5-7); n=63	2,5 (0-5); n=10	0,0060
RANKL	5 (3-5); n=62	2 (0-3); n=10	0,0032
RANK	7 (6-7); n=62	5 (3-5); n=10	0,0004
SDF-1	6 (5-7); n=62	3,5 (0-5); n=10	0,0031
CXCR-4	5 (4-6); n=62	0 (0-3); n=10	<0,0001
IL-6	4 (2-5); n=60	0 (0-3); n=10	0,0075

Ligandos y receptores	CEpTM	CEpM del tejido no neoplásico	p
IL-6-R	6 (5-7); n=56	3 (2-6); n=9	0,0036
M-CSF	0 (0-1); n=59	Negativo; n=10	NA
CD115	Negativo; n=59	Negativo; n=10	NA
CCL-2	4 (3-6); n=58	0 (0-1); n=8	0,0003
CCR-2	5 (4-6); n=59	2 (0-3); n=8	0,0007

Tabla 4. Expresión de osteoprotegerina (OPG), ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL), receptores del ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL-R)1-4, ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa β (RANKL), receptor activador para el factor nuclear kappa β (RANK), factor derivado de células estromales (SDF)-1, receptor de la quimioquina CXC (CXCR)-4, interleuquina (IL)-6, receptor de la IL-6 (IL-6-R), factor estimulante de colonias-monocíticas/macrófagos (M-CSF), CD115, ligando de la quimioquina CC (CCL)-2 y receptor de la quimioquina CC (CCR)-2 en las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM) y células epiteliales mamarias (CEpM) del tejido tumoral y no neoplásico, respectivamente, por inmunohistoquímica. Los valores se expresan en score final [mediana (rango intercuartilo)]. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test de Mann Whitney. NA= no aplica.

Además, la expresión de TRAIL y RANKL en las CE, del tejido mamario tumoral fue significativamente mayor que en el tejido mamario no neoplásico (Tabla 5 y Figura 4. A).

Ligandos	Células estromales del tejido mamario tumoral	Células estromales del tejido mamario no neoplásico	p ^Δ
OPG	2 (0-4); n=60	Negativo; n=10	NA
TRAIL	4 (2-5); n=60	0 (0-2); n=10	0,0002
RANKL	4 (2-5); n=62	2 (0-4); n=10	0,0343
SDF-1	3 (2-4); n=62	1 (0-4); n=10	0,1996
IL-6	2 (0-4); n=60	Negativo; n=10	NA
M-CSF	Negativo; n=59	Negativo; n=10	NA
CCL-2	2 (0-3); n=58	Negativo; n=8	NA

Tabla 5. Expresión de osteoprotegerina (OPG), ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL), ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa β (RANKL), factor derivado de células estromales (SDF)-1, interleuquina (IL)-6, factor estimulante de colonias-monocíticas/macrófagos (M-CSF) y ligando de la quimioquina CC (CCL)-2 en las células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura, del tejido mamario tumoral y no neoplásico por inmunohistoquímica. Los valores se expresan en score final [mediana (rango intercuartilo)]. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test de Mann Whitney. NA= no aplica.

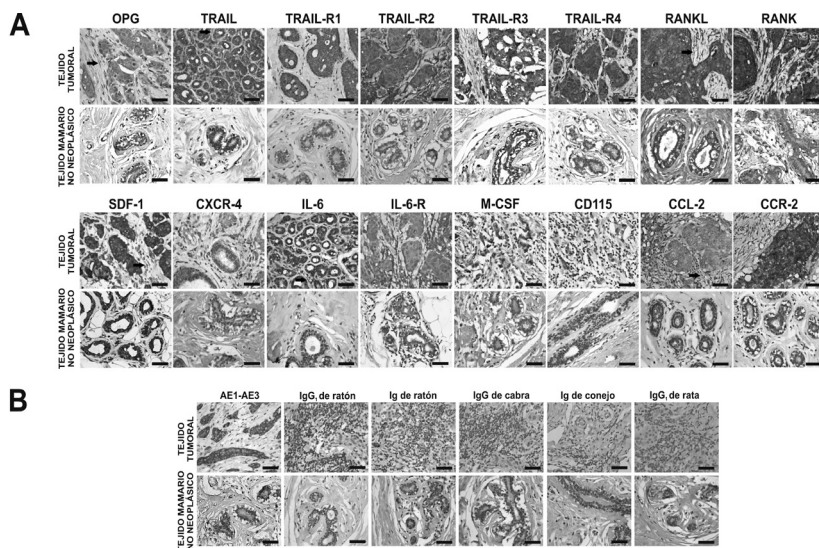


Figura 4. A. Ejemplificación representativa de la expresión de osteoprotegerina (OPG), ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL), receptores del ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL-R)1-4, ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa β (RANKL), receptor activador para el factor nuclear kappa β (RANK), factor derivado de células estromales (SDF)-1, receptor de la quimioquina CXC (CXCR)-4, interleuquina (IL)-6, receptor de la IL-6 (IL-6-R), factor estimulante de colonias-monocíticas/macrófagos (M-CSF), CD115, ligando de la quimioquina CC (CCL)-2 y receptor de la quimioquina CC (CCR)-2 en las células epiteliales mamarias y en las células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura, del tejido tumoral de las pacientes con cáncer de mama y tejido mamario no neoplásico por inmunohistoquímica. Las flechas indican immuno-reacción positiva para los ligandos evaluados en las células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura, de tejido tumoral mamario. **B.** Además, se incubaron ambos tipos de tejidos con anticuerpos anti-citoqueratina AE1-AE3 como control positivo. Más aún, también se los incubó con inmunoglobulinas (Ig)G1 de ratón, Ig de ratón, IgG de cabra, Ig de conejo e IgG1 de rata como controles de isotipo. Visualización en microscopio óptico (400X). Las barras de escala representan 50 μ m. Tinción: Peroxidasa-DAB/Hematoxilina.

Evaluación de la asociación de la expresión de α -SMA, FSP, CD105 y CD146 en las CE con las características clínico-patológicas de las pacientes

Observamos que las pacientes con expresión positiva para FSP tuvieron un tiempo libre de MTsO y sobrevida significativamente mayor en comparación con aquellas que presentaron expresión negativa para este marcador [datos expresados en meses como $X \pm ES$, test Log-rank (Mantel-Cox)]: tiempo libre de MTsO = $146,92 \pm 5,33$ y $109,93 \pm 13,60$; respectivamente, $p=0,0320$ y tiempo de sobrevida = $148,86 \pm 3,64$ y $114,10 \pm 13,36$; respectivamente, $p=0,0400$ (Figura 5). No ocurrió lo mismo con la expresión de α -SMA.

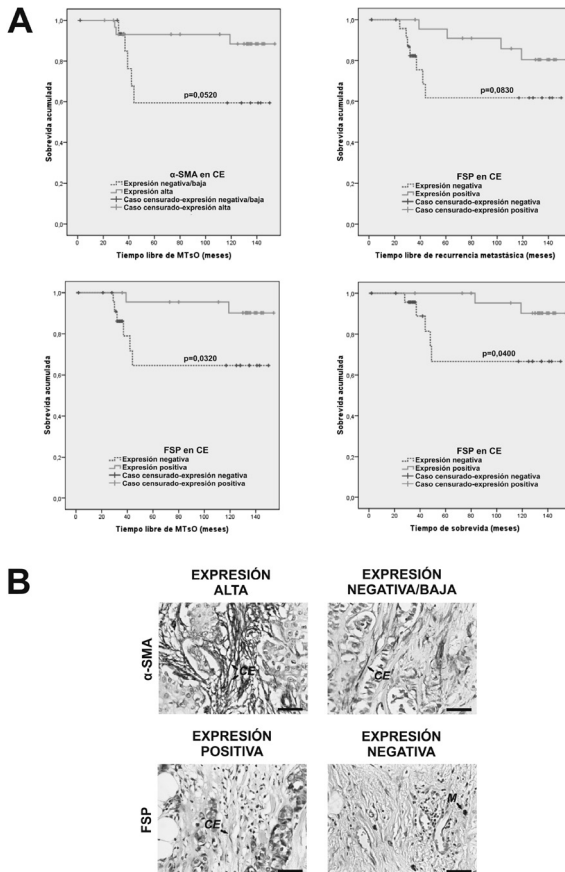


Figura 5. A. Estudio de la asociación de la expresión de actina del músculo liso tipo α (α -SMA) y proteína específica del fibroblasto (FSP) en las células estromales (CE) fusiformes, no asociadas a la vasculatura, en las muestras de tejido tumoral con el tiempo transcurrido post-cirugía libre de recurrencia metastásica, tiempo transcurrido post-cirugía libre de metástasis óseas (MTsO) y tiempo de sobrevida post-cirugía de las pacientes con cáncer de mama. El análisis estadístico se llevó a cabo a través de la construcción de curvas de sobrevida Kaplan-Meier analizadas mediante el test Log-rank (Mantel-Cox). **B.** Ejemplificación representativa de expresión alta y negativa/baja de α -SMA, así como de expresión positiva y negativa de FSP en las CE fusiformes, no asociadas a la vasculatura, en las muestras de tejido tumoral de las pacientes. Las flechas indican immuno-reacción positiva en las CE evaluadas, así como en macrófagos (M) utilizados como control positivo interno según describimos anteriormente. Visualización en microscopio óptico (400X). Las barras de escala representan 50 μ m. Tinción: Peroxidasa-DAB/Hematoxilina.

Por otro lado, la expresión alta de CD105 estuvo asociada con los tumores ≥ 2 cm de tamaño y con mayor riesgo de desarrollar metástasis (Tabla 6). Si tenemos en cuenta el primer sitio de metástasis, encontramos que este marcador podría predecir la ocurrencia de MTsO en estas pacientes (Figura 6).

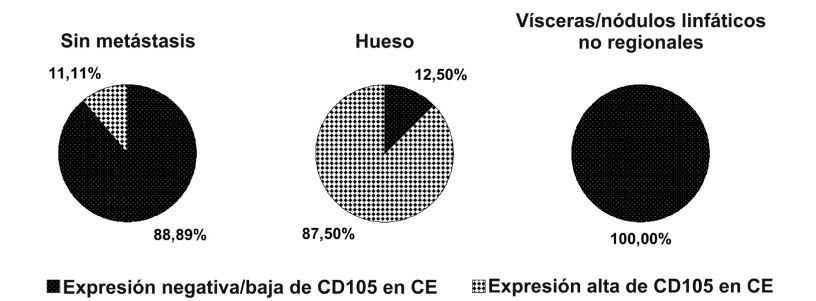


Figura 6. Porcentaje de pacientes con tumores de mama primarios que presentaron expresión negativa/baja o alta de CD105 en las células estromales (CE) fusiformes, no asociadas a la vasculatura, según el primer sitio de metástasis. ($p < 0,0001$; test Exacto de Fisher)

Interesantemente, las pacientes con expresión alta de CD105 se asociaron significativamente con un tiempo menor libre de enfermedad, de recurrencia metastásica, de MTsO y sobrevida que las pacientes con bajas expresión (Tabla 7 y Figura 7).

Datos clínico-patológicos	CD105 en CE		p
	Expresión alta	Expresión negativa/baja	
Tiempo post-cirugía libre de enfermedad	*70,64±15,40	132,01±7,62	*0,0010
Tiempo post-cirugía libre de recurrencia metastásica	*81,73±15,45	136,11±6,66	*0,0010
Tiempo post-cirugía libre de MTsO	*81,73±15,45	145,37±4,53	*0,0001
Tiempo de sobrevida post-cirugía	*96,62±15,51	143,58±4,42	*0,0010

Tabla 7. Estudio de la asociación de la expresión de CD105 en las células estromales (CE) fusiformes, no asociadas a la vasculatura, en las muestras de tejido tumoral con el tiempo transcurrido post-cirugía libre de enfermedad, tiempo transcurrido post-cirugía libre de recurrencia metastásica, tiempo transcurrido post-cirugía libre de metástasis óseas (MTsO) y tiempo de sobrevida post-cirugía de las pacientes con cáncer de mama. El análisis estadístico se llevó a cabo a través de la construcción de curvas de sobrevida Kaplan-Meier analizadas mediante el test Log-rank (Mantel-Cox). Los datos se expresan en meses como $X \pm ES$. La expresión alta de CD105 (*) se asocia significativamente con los tiempos.

Características	α -SMA			FSP			Marcadores de CE			CD105			CD146		
	n	Expresión alta [n (%)]	p	n	Positivo [n (%)]	p	n	Positivo [n (%)]	p	n	Expresión alta [n (%)]	p	n	Positivo [n (%)]	p
Edad (años)															
< 50	8	5 (62.50)	>0,9999	8	3 (37.50)	0,7032	8	2 (25.00)	>0,9999	8	2 (25.00)	>0,9999	8	2 (25.00)	0,4448
≥ 50	41	26 (63.41)		40	20 (50.00)		39	9 (23.08)		43	19 (44.19)				
Tamaño tumoral (cm)															
< 2	39	28 (71.79)	0,1913	38	22 (57.89)	0,2147	38	5 (13.16)	0,0210	41	16 (39.02)		41	16 (39.02)	
≥ 2	14	7 (50.00)		14	5 (35.71)		13	6 (46.15)		14	6 (42.86)		14	6 (42.86)	>0,9999
Grado Histológico															
G1	13	10 (76.92)		13	9 (69.23)		13	1 (7.69)		15	6 (40.00)		15	6 (40.00)	
G2	17	11 (64.71)	0,7030	16	7 (43.75)	0,3560	17	4 (23.53)	0,3870	17	5 (29.41)		17	5 (29.41)	0,5700
G3	23	14 (60.87)		23	11 (47.83)		21	6 (28.57)		23	11 (47.83)		23	11 (47.83)	
HER2/neu															
Negativo	32	20 (62.50)	0,5647	31	15 (48.39)	0,5822	28	6 (21.43)	>0,9999	32	12 (37.50)		32	12 (37.50)	0,7818
Positivo	21	15 (71.43)		21	12 (57.14)		23	5 (21.74)		23	10 (43.48)				
ER															
Negativo	15	10 (66.67)	>0,9999	15	7 (46.67)	0,7619	13	3 (23.08)	>0,9999	15	8 (53.33)		15	8 (53.33)	0,2396
Positivo	38	25 (65.79)		37	20 (54.05)		38	8 (21.05)		40	14 (35.00)		40	14 (35.00)	
PR															
Negativo	14	8 (57.14)	0,5147	14	6 (42.86)	0,5364	12	2 (16.67)	0,7158	14	8 (57.14)		14	8 (57.14)	0,2059
Positivo	39	27 (69.23)		38	21 (55.26)		39	9 (23.08)		41	14 (34.15)				
Nódulos linfáticos regionales															
Negativo	38	28 (73.68)	0,0524	37	22 (59.46)	0,2086	36	5 (13.89)	0,1180	40	15 (37.50)		40	15 (37.50)	0,7582
Positivo	14	6 (42.86)		14	5 (35.71)		14	5 (35.71)		14	6 (42.86)		14	6 (42.86)	
Recurrencia metastásica															
Negativo	37	25 (67.57)	0,4856	37	19 (51.35)	0,6180	36	4 (11.11)	0,0012	39	14 (35.90)		39	14 (35.90)	0,3109
Positivo	11	6 (54.55)		11	4 (36.36)		11	7 (63.64)		11	6 (54.55)				
Recidiva local															
Negativo	43	28 (65.12)	>0,9999	44	21 (47.73)	>0,9999	42	9 (21.43)	0,5776	45	18 (40.00)		45	18 (40.00)	>0,9999
Positivo	5	3 (60.00)		4	2 (50.00)		5	2 (40.00)		5	2 (40.00)		5	2 (40.00)	

Tabla 6. Estudio de la asociación de la expresión de actina del músculo liso tipo α (α -SMA), proteína específica del fibroblasto (FSP), CD105 y CD146 en las células estromales (CE) fusiformes, no asociadas a la vasculatura, en las muestras de tejido tumoral con los marcadores de pronóstico clásicos, recurrencia metastásica y recidiva local de las pacientes con cáncer de mama. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test Exacto de Fisher. ER: receptor de estrógeno, PR: receptor de progesterona.

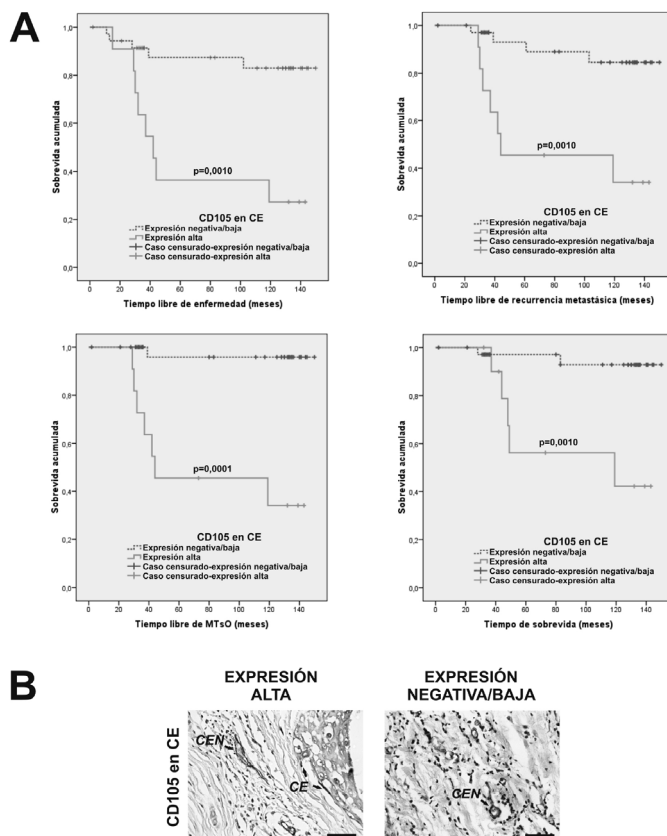


Figura 7. A. Estudio de la asociación de la expresión de CD105 en las células estromales (CE) fusiformes, no asociadas a la vasculatura, en las muestras de tejido tumoral con el tiempo transcurrido post-cirugía libre de enfermedad, tiempo transcurrido post-cirugía libre de recurrencia metastásica, tiempo transcurrido post-cirugía libre de metástasis óseas (MTsO) y tiempo de sobrevida post-cirugía de las pacientes con cáncer de mama. El análisis estadístico se llevó a cabo a través de la construcción de curvas de sobrevida Kaplan-Meier analizadas mediante el test Log-rank (Mantel-Cox). **B.** Ejemplificación representativa de expresión alta y negativa/baja de CD105 en las CE fusiformes, no asociadas a la vasculatura, en las muestras de tejido tumoral de las pacientes. Las flechas indican inmuno-reacción positiva en las CE evaluadas, así como en células endoteliales (CEN) utilizadas como control positivo interno según describimos anteriormente. Visualización en microscopio óptico (400X). Las barras de escala representan 50 μ m. Tinción: Peroxidasa-DAB/Hematoxilina.

Evaluación de la asociación de la expresión de los “parámetros de pronóstico no clásicos” (ligandos y receptores) en las CE y TEpC con las características clínico-patológicas de las pacientes

Encontramos que la expresión alta de OPG en las CE estuvo asociada significativamente con un riesgo mayor de desarrollar metástasis ($p=0,0386$) (Tabla 8), sin asociarse a ningún sitio metastásico en particular.

Además, la expresión alta de CCL-2 en las CE, tuvo una tendencia a asociarse con la recurrencia metastásica de nuestras pacientes ($p=0,0515$) (Tabla 8) y al tener en cuenta el sitio de metástasis, el CCL-2 en estas células podría constituir un biomarcador predictivo de la aparición de metástasis en visceras/nódulos linfáticos no regionales ($p=0,0300$) (Figura 8).

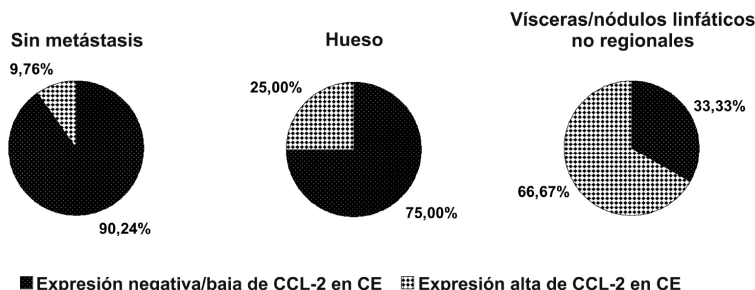


Figura 8. Porcentaje de pacientes con tumores de mama primarios que presentaron expresión negativa/baja o alta del ligando de la quimoquina CC (CCL)-2 en las células estromales (CE) fusiformes, no asociadas a la vasculatura, según el primer sitio de metástasis, test Exacto de Fisher.

Por otro lado, la expresión de SDF-1 en las CE mostró estar asociada significativamente con el grado histológico de dichos tumores ($p=0,0420$) (Tabla 8).

La expresión alta de TRAIL-R3 en las CEpTM estuvo asociada significativamente con un riesgo mayor de desarrollar metástasis ($p=0,0325$) (Tabla 9) y al tener en cuenta el primer sitio metastásico, encontramos que este marcador podría ser un indicador de la ocurrencia de metástasis en hueso ($p=0,0220$) (Figura 9).

cas	OPG			TRAIL			RANKL			Ligandos en CF			SDF-1			IL-6			CCU-2		
	n	Expresión alta [n (%)]	p	n	Expresión alta [n (%)]	p	n	Expresión alta [n (%)]	p	n	p	n	Expresión alta [n (%)]	p	n	n	Expresión alta [n (%)]	p	n	Expresión alta [n (%)]	p
local (cm)	9	4 (44,44)	>0,9999	8	5 (62,50)	0,2377	47	35 (74,47)	0,6884	9	3 (33,33)	0,2771	8	2 (25,00)	0,5885	8	2 (25,00)	0,0109	8	2 (25,00)	0,0109
	45	18 (40,00)		46	16 (34,78)					47	27 (57,45)		46	6 (13,04)		45	7 (15,56)		45	7 (15,56)	
local (cm)	43	21 (48,84)	0,2552	42	16 (38,10)	>0,9999	44	30 (68,18)	0,1930	44	25 (56,82)	0,3919	42	9 (21,43)	0,4838	41	8 (19,51)	0,7085	41	8 (19,51)	0,7085
	16	5 (31,25)		17	7 (41,18)		17	15 (88,24)		17	7 (41,18)		17	2 (11,76)		16	2 (12,50)		16	2 (12,50)	
local (cm)	15	9 (60,00)		14	5 (35,71)		15	9 (60,00)		15	10 (66,67)		14	3 (21,43)		15	5 (33,33)		15	5 (33,33)	
	20	7 (35,00)	0,3360	20	10 (50,00)	0,5180	21	16 (76,19)	0,4910	21	14 (66,67)	0,0420	20	4 (20,00)	0,7410	19	1 (5,26)	0,1160	19	1 (5,26)	0,1160
local (cm)	23	9 (39,13)		24	8 (33,33)		24	19 (79,17)		24	8 (33,33)		24	3 (12,50)		23	4 (17,39)		23	4 (17,39)	
	36	16 (44,44)	>0,9999	38	17 (44,74)	0,2728	38	30 (78,95)	0,3680	38	22 (57,89)	0,3024	38	7 (18,42)	>0,9999	35	6 (17,14)	>0,9999	35	6 (17,14)	>0,9999
local (cm)	23	10 (43,48)		21	6 (28,57)		23	15 (69,22)		23	10 (43,48)		21	4 (19,05)		22	4 (18,18)		22	4 (18,18)	
	15	7 (46,67)	>0,9999	14	6 (42,86)	0,7618	15	12 (80,00)	0,7381	15	8 (53,33)	>0,9999	14	3 (21,43)	>0,9999	15	3 (20,00)	>0,9999	15	3 (20,00)	>0,9999
local (cm)	44	19 (43,18)		45	17 (37,78)		46	33 (71,74)		46	24 (52,17)		45	8 (17,78)		42	7 (16,67)		42	7 (16,67)	
	14	6 (42,86)	>0,9999	13	4 (30,77)	0,5402	14	11 (78,57)	0,7421	14	7 (50,00)	>0,9999	13	2 (15,38)	>0,9999	14	1 (7,14)	0,4228	14	1 (7,14)	0,4228
local (cm)	45	20 (44,44)		46	19 (41,30)		47	34 (72,34)		47	25 (53,19)		46	9 (19,57)		43	9 (20,93)		43	9 (20,93)	
	43	20 (46,51)	0,5476	41	17 (41,46)	>0,9999	43	32 (74,42)	0,7456	43	24 (55,81)	0,7730	41	7 (17,07)	>0,9999	42	8 (19,05)	0,7242	42	8 (19,05)	0,7242
local (cm)	14	5 (35,71)		16	6 (37,50)		16	11 (68,75)		16	8 (50,00)		16	3 (18,75)		14	2 (14,29)		14	2 (14,29)	
	43	14 (32,56)	0,0386	43	15 (34,88)	0,0728	44	29 (65,91)	0,1465	44	21 (47,73)	0,7458	43	5 (11,63)	0,3269	41	4 (9,76)	0,0515	41	4 (9,76)	0,0515
local (cm)	10	7 (70,00)		10	7 (70,00)		11	10 (90,91)		11	6 (54,55)		10	3 (30,00)		11	4 (36,36)		11	4 (36,36)	
	48	19 (39,58)	>0,9999	49	21 (42,86)	0,6332	50	36 (72,00)	0,6217	50	25 (50,00)	>0,9999	49	8 (16,33)	0,6123	47	7 (14,88)	>0,9999	47	7 (14,88)	>0,9999
local (cm)	5	2 (40,00)		4	1 (25,00)		5	3 (60,00)		5	2 (40,00)		4	0 (0,00)		5	1 (20,00)		5	1 (20,00)	

Tabla 8. Estudio de la asociación de la expresión de osteoprotegerina (OPG), ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL), ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa β (RANKL), factor derivado de células estromales (SDF)-1, interleuquina (IL)-6 y ligando de la quimquina CC (CCU)-2 en las células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura, en las muestras de tejido tumoral con los marcadores de pronóstico clásicos, recurrencia metastásica y recidiva local de las pacientes con cáncer de mama. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test Exacto de Fisher. ER: receptor de estrógeno, PR: receptor de progesterona.

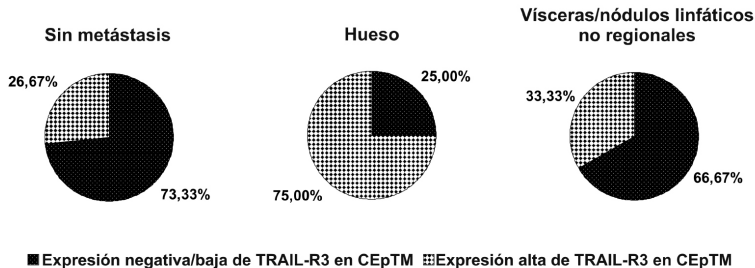


Figura 9. Porcentaje de pacientes con tumores de mama primarios que presentaron expresión negativa/baja o alta del receptor del ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL-R)3 en las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM), según el primer sitio de metástasis; test Exacto de Fisher.

Además, encontramos que las pacientes con expresión alta de TRAIL-R3 en las CEpTM tuvieron un tiempo menor libre de enfermedad, de recurrencia metastásica, de MTsO y sobrevida en comparación con aquellas que presentaron expresión negativa/baja de dicho marcador, siendo estas asociaciones significativas en todos los casos ($p=0,0090$; $0,0120$; $0,0050$ y $0,0150$; respectivamente) (Tabla 9 y Figura 10).

Por otro lado, encontramos que la expresión alta de CCR-2 en las CEpTM estuvo asociada significativamente con un riesgo mayor de desarrollar metástasis en las PCM ($p=0,0027$) (Tabla 11) y al tener en cuenta el primer sitio de metástasis encontramos que esta molécula podría ser un predictor de MTsO en estas pacientes ($p=0,0040$) (Figura 11).

Además, observamos que las PCM con expresión alta de CCR-2 en las CEpTM tuvieron un tiempo menor libre de enfermedad, de recurrencia metastásica, de MTsO y sobrevida ($p=0,0130$; $0,0020$; $0,0030$ y $0,0450$; respectivamente) (Tabla 12 y Figura 12).

También observamos que la expresión alta de IL-6-R estuvo asociada significativamente con las pacientes < 50 años ($p=0,0338$) (Tabla 11).

Por otro lado, encontramos que las pacientes con tumores ≥ 2 cm tuvieron un tiempo libre de recurrencia metastásica y MTsO significativamente menor en comparación con aquellas que presentaron tumores < 2 cm [datos expresados en meses como $X \pm ES$, test Log-rank (Mantel-Cox)]: $93,01 \pm 15,60$ vs $139,02 \pm 6,47$ ($p=0,0200$) y $93,00 \pm 15,60$ vs $147,89 \pm 4,57$ ($p=0,0010$); respectivamente.

Características		TRAIL-R1			Receptores en CEP7M			TRAIL-R3			TRAIL-R4		
		n	Expresión alta [n (%)]	p	n	Expresión alta [n (%)]	p	n	Expresión alta [n (%)]	p	n	Expresión alta [n (%)]	p
Edad (años)													
< 50		7	6 (85,71)	0,4029	8	0 (0,00)	0,5898	9	4 (44,44)	0,7054	9	7 (77,78)	0,2772
≥ 50		47	30 (63,83)		47	5 (10,64)		48	16 (33,33)		48	26 (54,17)	
Tamaño tumoral (cm)													
< 2		42	28 (66,67)	>0,9999	43	4 (9,30)	>0,9999	45	16 (35,56)	>0,9999	45	26 (57,78)	>0,9999
≥ 2		17	11 (64,71)		17	1 (5,88)		17	6 (35,29)		17	10 (58,82)	
Grado Histológico													
G1		14	10 (71,43)		15	2 (13,33)		15	5 (33,33)		15	9 (60,00)	
G2		20	11 (55,00)	0,3970	20	0 (0,00)	0,2450	22	8 (36,36)	>0,9999	22	14 (63,64)	0,8030
G3		24	18 (75,00)		24	3 (12,50)		24	9 (37,50)		24	13 (54,17)	
HER2/neu													
Negativo		37	22 (59,46)	0,2554	37	2 (5,41)	0,3619	39	10 (25,64)	0,0540	39	20 (51,28)	0,1905
Positivo		22	17 (77,27)		23	3 (13,04)		23	12 (52,17)		23	16 (69,57)	
ER													
Negativo		15	10 (66,67)	>0,9999	15	2 (13,33)	0,5908	15	8 (53,33)	0,1257	15	9 (60,00)	>0,9999
Positivo		44	29 (65,91)		45	3 (6,67)		47	14 (29,79)		47	27 (57,45)	
PR													
Negativo		14	9 (64,29)	>0,9999	14	2 (14,29)	0,5817	14	6 (42,86)	0,5391	14	8 (57,14)	>0,9999
Positivo		45	30 (66,67)		46	3 (6,52)		48	16 (33,33)		48	28 (58,33)	
Nódulos linfáticos regionales													
Negativo		42	27 (64,29)	0,3422	43	4 (9,30)	>0,9999	44	16 (36,36)	>0,9999	44	27 (61,36)	0,7713
Positivo		15	12 (80,00)		15	1 (6,67)		16	6 (37,50)		16	9 (56,25)	
Recurrencia metastásica													
Negativo		42	28 (66,67)	0,1488	43	2 (4,65)	>0,9999	45	12 (26,67)	0,0325	45	23 (51,11)	0,0925
Positivo		11	10 (90,91)		11	1 (9,09)		11	7 (63,64)		11	9 (81,82)	
Recidiva local													
Negativo		48	34 (70,83)	>0,9999	49	2 (4,08)	0,2572	51	16 (31,37)	0,3237	51	29 (56,86)	>0,9999
Positivo		5	4 (80,00)		5	1 (20,00)		5	3 (60,00)		5	3 (60,00)	

Tabla 9. Estudio de la asociación de la expresión de los receptores de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL-R)1-4 en las células epiteliales tumorales mamarias (CEPTM) de los tumores primarios de cáncer de mama con los marcadores de pronóstico clásicos, recurrencia metastásica y recidiva local de dichas pacientes. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test Exacto de Fisher. ER: receptor de estrógeno, PR: receptor de progesterona.

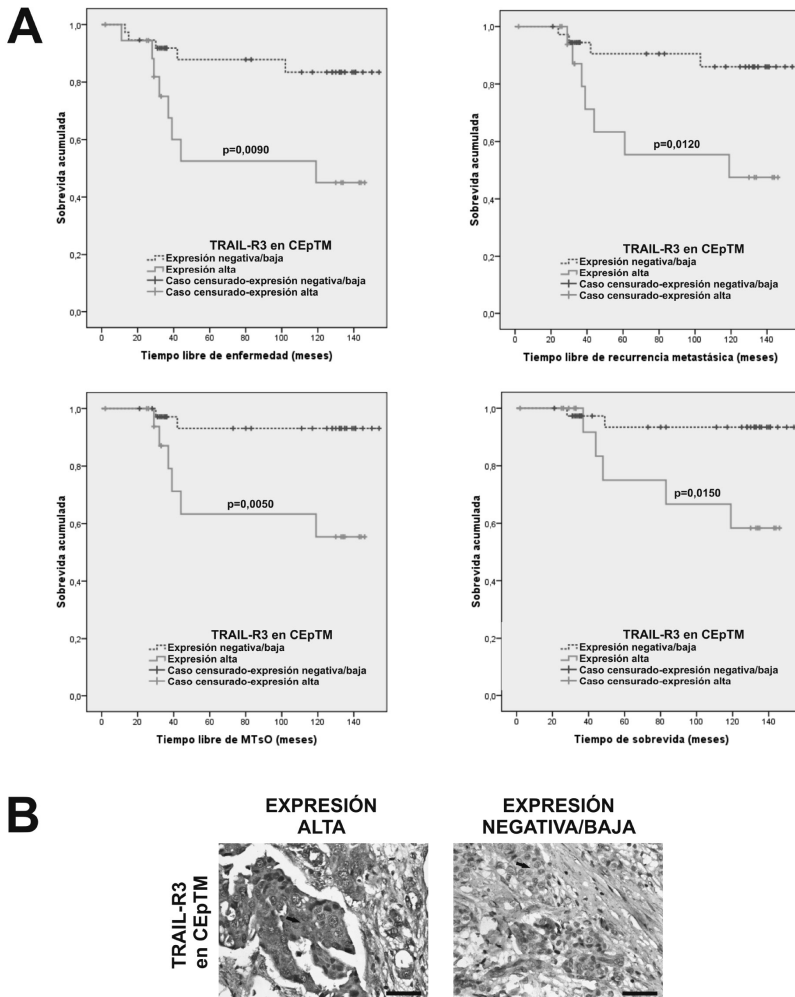


Figura 10. A. Estudio de la asociación de la expresión del receptor del ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL-R)3 en las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM) en las muestras de tejido tumoral con el tiempo transcurrido post-cirugía libre de enfermedad, tiempo transcurrido post-cirugía libre de recurrencia metastásica, tiempo transcurrido post-cirugía libre de metástasis óseas (MTsO) y tiempo de sobrevida post-cirugía de las pacientes con cáncer de mama. El análisis estadístico se llevó a cabo a través de la construcción de curvas de sobrevida Kaplan-Meier analizadas mediante el test Log-rank (Mantel-Cox). **B.** Ejemplificación representativa de expresión alta y negativa/baja de TRAIL-R3 en las CEpTM de las muestras de tejido tumoral de las pacientes. Las flechas indican inmuno-reacción positiva en las CEpTM. Visualización en microscopio óptico (400X). Las barras de escala representan 50 μ m. Tinción: Peroxidasa-DAB/Hematoxilina.

Datos clínico-patológicos	CCR-2 en CEpTM		p
	Expresión alta	Expresión negativa/baja	
<i>Tiempo post-cirugía libre de enfermedad</i>	<i>*87,57±18,57</i>	<i>127,57±8,42</i>	<i>*0,0130</i>
<i>Tiempo post-cirugía libre de recurrencia metastásica</i>	<i>*87,71±18,59</i>	<i>133,94±7,52</i>	<i>*0,0020</i>
<i>Tiempo post-cirugía libre de MTsO</i>	<i>*93,86±20,12</i>	<i>139,57±6,80</i>	<i>*0,0030</i>
<i>Tiempo de sobrevida post-cirugía</i>	<i>*114,67±15,29</i>	<i>140,44±6,41</i>	<i>*0,0450</i>

Tabla 10. Estudio de la asociación de la expresión del receptor del ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL-R)3 en las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM) con el tiempo transcurrido post-cirugía libre de enfermedad, tiempo transcurrido post-cirugía libre de recurrencia metastásica, tiempo transcurrido post-cirugía libre de metástasis óseas (MTsO) y tiempo de sobrevida post-cirugía de las pacientes con cáncer de mama. El análisis estadístico se llevó a cabo a través de la construcción de curvas de sobrevida Kaplan-Meier analizadas mediante el test Log-rank (Mantel-Cox). Los datos se expresan en meses como $\bar{X} \pm \text{ES}$. La expresión alta de TRAIL-R3 en CEpTM (*) se asocia significativamente con los tiempos.

El análisis multivariado indicó que la expresión de CD105 en las CE es un indicador predictivo independiente del tiempo post-cirugía libre de enfermedad ($p=0,0100$), la expresión de CCR-2 en las CEpTM y el tamaño de los tumores mamarios son indicadores predictivos independientes del tiempo post-cirugía libre de recurrencia metastásica ($p=0,0177$ y $0,0089$; respectivamente) y más aún, encontramos que la expresión de CD105 en las CE, CCR-2 en las CEpTM y el tamaño tumoral son indicadores predictivos independientes del tiempo post-cirugía libre de MTsO de las PCM ($p=0,0166$, $0,0149$ y $0,00$

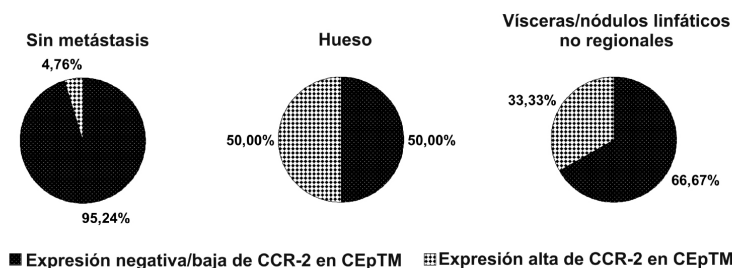


Figura 11. Porcentaje de pacientes con tumores de mama primarios que presentaron expresión negativa/baja o alta del receptor de la quimoquina CC (CCR)-2 en las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM), según el primer sitio de metástasis; test Exacto de Fisher.

Características		RANK		Receptores en CÉPTM		IL-6-R		CCR-2	
	n	Expresión alta [n (%)]	p	n	Expresión alta [n (%)]	p	n	Expresión alta [n (%)]	p
Edad (años)									
< 50	9	3 (33.33)	0.2884	9	4 (44.44)	0.2473	7	5 (71.43)	0.0338
≥ 50	47	26 (55.32)		47	33 (70.21)		44	12 (27.27)	
Tamaño tumoral (cm)									
< 2	44	22 (50.00)	0.5795	44	30 (68.18)	>0.9999	38	12 (31.58)	0.3650
≥ 2	17	10 (58.82)		17	12 (70.59)		17	8 (47.06)	
Grado Histológico									
G1	15	8 (53.33)		15	10 (66.67)		13	5 (38.46)	
G2	21	11 (52.38)	>0.9999	21	15 (71.43)	0.9410	18	3 (16.67)	0.0780
G3	24	12 (50.00)		24	16 (66.67)		24	12 (50.00)	
HER2/neu									
Negativo	38	20 (52.63)	>0.9999	38	27 (71.05)	0.7765	34	9 (26.47)	0.0830
Positivo	23	12 (52.17)		23	15 (65.22)		21	11 (52.38)	
ER									
Negativo	15	9 (60.00)	0.5625	15	11 (73.33)	0.7574	15	7 (46.67)	0.3610
Positivo	46	23 (50.00)		46	31 (67.39)		40	13 (32.50)	
PR									
Negativo	14	8 (57.14)	0.7666	14	11 (78.57)	0.5164	14	5 (35.71)	>0.9999
Positivo	47	24 (51.06)		47	31 (65.96)		41	15 (36.59)	
Módulos linfáticos regionales									
Negativo	43	24 (55.81)	0.5589	43	31 (72.09)	0.5330	40	14 (35.00)	0.7494
Positivo	16	7 (43.75)		16	10 (62.50)		14	6 (42.86)	
Recurrencia metastásica									
Negativo	44	22 (50.00)	>0.9999	44	31 (70.45)	0.4734	39	12 (30.77)	0.1718
Positivo	11	5 (45.45)		11	6 (54.55)		11	6 (54.55)	
Residua local									
Negativo	50	24 (48.00)	0.6695	50	35 (70.00)	0.3165	45	16 (35.56)	>0.9999
Positivo	5	3 (60.00)		5	2 (40.00)		5	2 (40.00)	

Tabla 11. Estudio de la asociación de la expresión del receptor activador para el factor nuclear kappa β (RANK), receptor de la quimquina CXC (CXCR)-4, receptor de la IL-6 (IL-6-R) y receptor de la quimquina CC (CCR)-2 en las células epiteliales tumorales mamarias (CÉPTM) de los tumores primarios de cáncer de mama con los marcadores de pronóstico clásicos, recurrencia metastásica y recidiva local de dichas pacientes. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test Exacto de Fisher. ER: receptor de estrógeno, PR: receptor de progesterona.

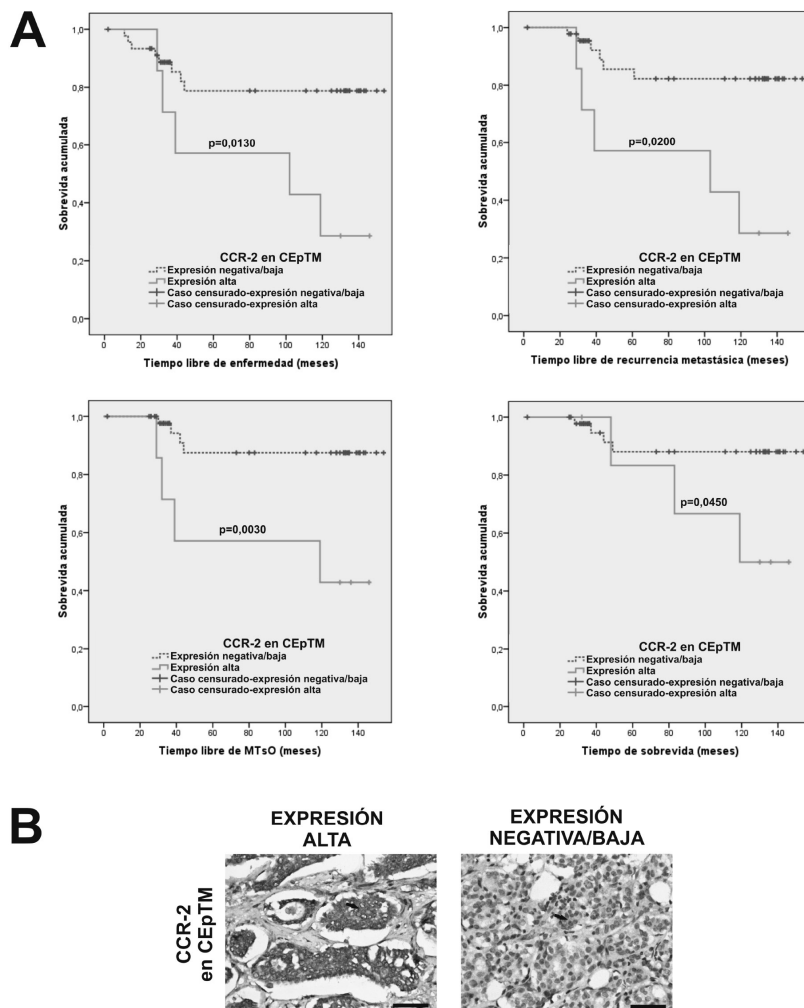


Figura 12. A. Estudio de la asociación de la expresión del receptor de la quimquina CC (CCR)-2 en las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM) en las muestras de tejido tumoral con el tiempo transcurrido post-cirugía libre de enfermedad, tiempo transcurrido post-cirugía libre de recurrencia metastásica, tiempo transcurrido post-cirugía libre de metástasis óseas (MTsO) y tiempo de supervivencia post-cirugía de las pacientes con cáncer de mama. El análisis estadístico se llevó a cabo a través de la construcción de curvas de supervivencia Kaplan-Meier analizadas mediante el test Log-rank (Mantel-Cox). **B.** Ejemplificación representativa de expresión alta y negativa/baja de CCR-2 en las CEpTM de las muestras de tejido tumoral de las pacientes. Las flechas indican immuno-reacción positiva en las CEpTM. Visualización en microscopio óptico (400X). Las barras de escala representan 50 µm. Tinción: Peroxidasa-DAB/Hematoxilina.

Datos clínico-patológicos	CCR-2 en CEpTM		p
	Expresión alta	Expresión negativa/baja	
<i>Tiempo post-cirugía libre de enfermedad</i>	<i>*87,57±18,57</i>	127,57±8,42	*0,0130
<i>Tiempo post-cirugía libre de recurrencia metastásica</i>	<i>*87,71±18,59</i>	133,94±7,52	*0,0020
<i>Tiempo post-cirugía libre de MTsO</i>	<i>*93,86±20,12</i>	139,57±6,80	*0,0030
<i>Tiempo de sobrevida post-cirugía</i>	<i>*114,67±15,29</i>	140,44±6,41	*0,0450

Tabla 12. Estudio de la asociación de la expresión del receptor de la quimioquina CC (CCR)-2 en las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM) con el tiempo transcurrido post-cirugía libre de enfermedad, tiempo transcurrido post-cirugía libre de recurrencia metastásica, tiempo transcurrido post-cirugía libre de metástasis óseas (MTsO) y tiempo de sobrevida post-cirugía de las pacientes con cáncer de mama. El análisis estadístico se llevó a cabo a través de la construcción de curvas de sobrevida Kaplan-Meier analizadas mediante el test Log-rank (Mantel-Cox). Los datos se expresan en meses como $X \pm ES$. La expresión alta de CCR-2 en CEpTM (*) se asocia significativamente con los tiempos.

DISCUSIÓN

Trabajo previos de Romero y colaboradores⁽²⁵⁾ observaron que la reducción de expresión de CD105 en células estromales derivadas de tejido prostático humano disminuye su capacidad proliferativa, migratoria y de reclutar células endoteliales, indicando la potencial importancia de CD105 en estas células estromales en la progresión del cáncer de próstata. Nuestros resultados mostraron expresión de CD105 en las CE sólo en el tejido tumoral, y su expresión alta estuvo asociada significativamente con un tamaño tumoral ≥ 2 cm, riesgo mayor de desarrollar metástasis, en particular MTsO, un tiempo menor libre de enfermedad, de recurrencia metastásica, de MTsO y de sobrevida de las PCM en estadios tempranos. Además, es importante destacar que el análisis multivariado mostró que la expresión de CD105 es un indicador predictivo independiente del tiempo libre de enfermedad, de MTsO y de sobrevida en dichas pacientes.

Por otro lado, encontramos que la expresión de OPG, TRAIL, RANKL, IL-6 y CCL-2 en las CE fue mayor en los tejidos tumorales que en el tejido mamario no neoplásico como indicaron estudios previos de otros autores⁽²⁶⁻²⁸⁾.

Además, la expresión alta de OPG estuvo asociada significativamente con un riesgo mayor de desarrollar metástasis. La OPG puede jugar papeles tanto pro- como anti-tumorales según se una a TRAIL o RANKL, lo cual dependerá de las concentraciones relativas de estas moléculas en el tejido tumoral mamario durante la progresión tumoral.

<i>Tiempos</i>	<i>Parámetros</i>	<i>RR</i>	<i>95% I. C.</i>	<i>p</i>
Tiempo post-cirugía libre de enfermedad	CD105 en CE			
	Expresión alta	4,53	1,43-14,33	0,0100
	Expresión negativa/baja	1	-	
	CCR-2 en CEpTM			
	Expresión alta	2,90	0,92-9,17	0,0695
	Expresión negativa/baja	1	-	
Tiempo post-cirugía libre de recurrencia metastásica	Número de vasos CD146 positivos/zona de alta vascularización			
	> 11	6,44	0,98-42,12	0,0521
	≤ 11	1	-	
	CCR-2 en CEpTM			
	Expresión alta	6,54	1,39-30,87	0,0177
	Expresión negativa/baja	1	-	
	Tamaño tumoral (cm)			
	≥ 2	9,87	1,78-54,86	0,0089
	< 2	1	-	
Tiempo post-cirugía libre de MTsO	CD105 en CE			
	Expresión alta	16,08	1,66-156,04	0,0166
	Expresión negativa/baja	1	-	
	CCR-2 en CEpTM			
	Expresión alta	15,74	1,71-144,87	0,0149
	Expresión negativa/baja	1	-	
	Tamaño tumoral (cm)			
	≥ 2	26,20	2,29-300,16	0,0096
	< 2	1	-	

Tabla 13. Análisis multivariado de los parámetros de pronóstico clásicos y no clásicos evaluados que estuvieron asociados significativamente con el tiempo transcurrido post-cirugía libre de enfermedad, tiempo transcurrido post-cirugía libre de recurrencia metastásica, tiempo transcurrido post-cirugía libre de metástasis óseas (MTsO) y tiempo de sobrevida post-cirugía de las pacientes con cáncer de mama. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis multivariado [Cox Proportional Hazards Model, Backward Stepwise (Likelihood Ratio)]. Se incluyeron en el modelo los siguientes parámetros: tiempo transcurrido post-cirugía libre de enfermedad: expresión de CD105 en las células estromales (CE) fusiformes, no asociadas a la vasculatura, del microambiente tumoral (MT) mamario, expresión del receptor del ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL-R)3 en las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM) y expresión del receptor de la quimioquina CC (CCR)-2 en las CEpTM; tiempo transcurrido post-cirugía libre de recurrencia metastásica: expresión de CD105 en las CE fusiformes no asociadas a la vasculatura, expresión de TRAIL-R3 en las CEpTM, expresión de CCR-2 en las CEpTM y tamaño tumoral y tiempo transcurrido post-cirugía libre de MTsO: expresión de CD105 en las CE fusiformes no asociadas a la vasculatura, expresión de TRAIL-R3 en las CEpTM, expresión de CCR-2 en las CEpTM y tamaño tumoral. RR: riesgo relativo. I.C.: intervalo de confianza. En esta tabla se muestra el último paso del análisis estadístico multivariado realizado por pasos hacia atrás.

Por otro lado, la literatura informó que la expresión alta de CCL-2 en el tejido tumoral⁽²⁹⁻³¹⁾ y en sangre⁽³²⁾ estuvo asociada con un pronóstico desfavorable para las PCM. Más aún, Hembruff y colaboradores⁽³³⁾ encontraron que la co-inyección de fibroblastos que liberan altos niveles de CCL-2 con las CEpTM de la línea 4T1 aumentó la progresión tumoral y que la expresión de un RNA de interferencia para CCL-2 en estos fibroblastos redujo el desarrollo de metástasis viscerales, en particular, en hígado. Interesantemente, nosotros encontramos que la expresión alta de CCL-2 en las CE podría constituir un marcador predictivo de la ocurrencia de metástasis en vísceras/nódulos linfáticos no regionales.

Es sabido que TRAIL induce apoptosis en las CEpTM, razón por la cual es empleado en numerosos ensayos clínicos. Sin embargo, conociendo que TRAIL-R3 y TRAIL-R4 podrían competir con TRAIL-R1 y TRAIL-R2 por la unión a TRAIL bloqueando su efecto apoptótico^(34,35); la expresión diferencial de estos receptores ayudaría a predecir la resistencia a la terapia con TRAILrh y el futuro comportamiento del tumor de mama primario. Nosotros encontramos que la expresión alta de TRAIL-R3 en las CEpTM se asoció significativamente con un riesgo mayor de desarrollar metástasis, con un tiempo menor libre de enfermedad, de recurrencia metastásica, de MTsO y de sobrevida de nuestras pacientes, indicando al TRAIL-R3 en las CEpTM de las PCM en estadios clínico-patológicos tempranos como un claro biomarcador de pronóstico desfavorable, en particular un predictor de la futura aparición de metástasis y en un tiempo menor.

Recordemos que el CCR-2 promueve los procesos de migración e invasión en las CEpTM/TSC luego de su unión a CCL-2⁽³⁶⁾ y que este último ligando es altamente liberado desde el microambiente hematopoyético de la MO (nicho pre-metastásico preferencial del CM)⁽³⁶⁻³⁸⁾. Encontramos que la expresión alta de CCR-2 estuvo asociada significativamente con un riesgo mayor de desarrollar metástasis y con un tiempo menor libre de enfermedad, de recurrencia metastásica, de MTsO y de sobrevida de estas pacientes. Interesantemente, el análisis multivariado de los datos arrojó que la expresión de CCR-2 es un indicador predictivo independiente del tiempo libre de recurrencia metastásica y de MTsO.

Este trabajo propone que los nuevos hallazgos aquí reportados (Figura 19) podrían ser la base del descubrimiento de nuevos "parámetros de pronóstico no clásicos" del CM, los cuales permitirían la identificación de las pacientes que se beneficiarían con una terapia determinada, así como podrían conducir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas adyuvantes para combatir el CM desde los estadios iniciales.

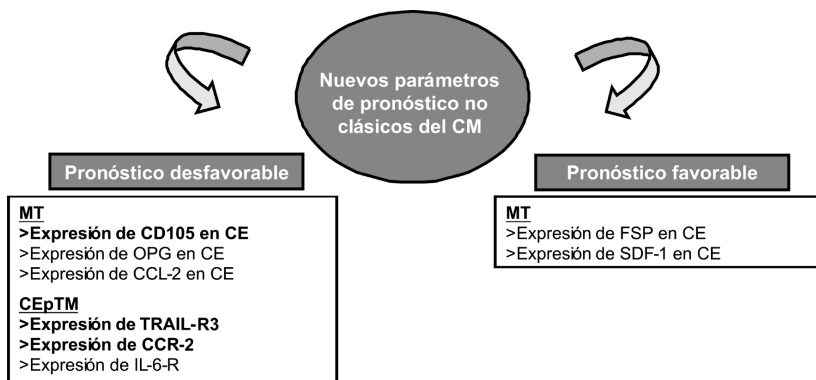


Figura 19. Principales parámetros de pronóstico no clásicos del cáncer de mama (CM) propuestos por este trabajo. Estos parámetros surgieron del análisis de los componentes del microambiente tumoral (MT), en particular la expresión de actina del músculo liso tipo α (α -SMA), proteína específica del fibroblasto (FSP), CD105 y CD146 en las células estromales (CE) fusiformes CD34 (-), no asociadas a la vasculatura, así como de la expresión de moléculas relacionadas con la proliferación, sobrevida, migración y metástasis de las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM) tanto en estas células estromales como en las propias CEpTM del tumor de mama primario (tejido ductal invasivo) de pacientes con CM en los estadios clínico-patológicos tempranos (I y II) de la enfermedad. OPG= osteoprotegerina, CCL-2= ligando de la quimioquina CC-2, TRAIL-R3= receptor del ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral-3, CCR-2= receptor de quimioquinas CC-2, IL-6-R= receptor de interleuquina-6, SDF-1= factor derivado de células estromales-1. Se destacan en negrita los parámetros que presentaron un mayor valor pronóstico en estas pacientes.

REFERENCIAS

1. Yang X, Hou J, Han Z, Wang Y, Hao C, Wei L, Shi Y (2013) One cell, multiple roles: contribution of mesenchymal stem cells to tumor development in tumor microenvironment. *Cell Biosci* 3: 5.
2. Bergfeld SA, DeClerck YA (2010) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 29: 249-261.
3. El-Haibi CP, Karnoub AE (2010) Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and therapy of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15: 399-409.
4. Rhodes LV, Muir SE, Elliott S, Guillot LM, Antoon JW, Penfornis P, Tilghman SL, Salvo VA, Fonseca JP, Lacey MR, Beckman BS, McLachlan JA, Rowan BG, Pochampally R, Burow ME (2010) Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence. *Breast Cancer Res Treat* 121: 293-300.
5. Lorusso G, Ruegg C (2008) The tumor microenvironment and its contribution to

- tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* 130: 1091-1103.
6. Garamszegi N, Garamszegi SP, Shehadeh LA, Scully SP (2009) Extracellular matrix-induced gene expression in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7: 319-329.
 7. Ali S, Lazennec G (2007) Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 26: 401-420.
 8. Ahn S, Cho J, Sung J, Lee J, Nam S, Kim K-M, Cho E (2012) The prognostic significance of tumor-associated stroma in invasive breast carcinoma. *Tumor Biology* 33: 1573-1580.
 9. Horimoto Y, Polanska UM, Takahashi Y, Orimo A (2012) Emerging roles of the tumor-associated stroma in promoting tumor metastasis. *Cell Adh Migr* 6: 193-202.
 10. Conklin MW, Keely PJ (2012) Why the stroma matters in breast cancer: insights into breast cancer patient outcomes through the examination of stromal biomarkers. *Cell Adh Migr* 6: 249-260.
 11. Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J (2013) Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 32: 303-315.
 12. Joyce JA, Pollard JW (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9: 239-252.
 13. Martin FT, Dwyer RM, Kelly J, Khan S, Murphy JM, Curran C, Miller N, Hennessy E, Dockery P, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ (2010) Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res Treat* 124: 317-326.
 14. Bhowmick NA, Moses HL (2005) Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 15: 97-101.
 15. Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, Korkaya H, Heath A, Dutcher J, Kleer CG, Jung Y, Dontu G, Taichman R, Wicha MS (2011) Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res* 71: 614-624.
 16. Paulsson J, Micke P (2014) Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. *Semin Cancer Biol* 25: 61-68.
 17. Surowiak P, Murawa D, Materna V, Maciejczyk A, Pudelko M, Ciesla S, Breborowicz J, Murawa P, Zabel M, Dietel M, Lage H (2007) Occurrence of stromal myofibroblasts in the invasive ductal breast cancer tissue is an unfavourable prognostic factor. *Anticancer Res* 27: 2917-2924.
 18. Rau KM, Huang CC, Chiu TJ, Chen YY, Lu CC, Liu CT, Pei SN, Wei YC (2012) Neovascularization evaluated by CD105 correlates well with prognostic factors in breast cancers. *Exp Ther Med* 4: 231-236.
 19. Labovsky V, Martinez LM, Davies KM, García-Rivello H, de Luján Calcagno M, Matas A, Fernández Vallone VB, Wernicke A, Choi H, Chasseing NA (2014) Association Between Ligands and Receptors Related to the Progression of Early Breast Cancer in Tumor Epithelial and Stromal Cells. *Clin Breast Cancer pii: S1526-8209(14)00113-X*.
 20. Wernicke M, Roitman P, Manfre D, Stern R (2011) Breast cancer and the stromal factor. The "prometastatic healing process" hypothesis. *Medicina (B Aires)* 71: 15-21.

21. Bloom HJ, Richardson WW (1957) Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11: 359-377.
22. Yazhou C, Wenlv S, Weidong Z, Licun W (2004) Clinicopathological significance of stromal myofibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumour Biol* 25: 290-295.
23. Hawsawi NM, Ghebeh H, Hendrayani SF, Tulbah A, Al-Eid M, Al-Tweigeri T, Ajaram D, Alaiya A, Dermime S, Aboussekhra A (2008) Breast carcinoma-associated fibroblasts and their counterparts display neoplastic-specific changes. *Cancer Res* 68: 2717-2725.
24. Yamashita M, Ogawa T, Zhang X, Hanamura N, Kashikura Y, Takamura M, Yoneda M, Shiraishi T (2012) Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer* 19: 170-176.
25. Romero D, O'Neill C, Terzic A, Contois L, Young K, Conley BA, Bergan RC, Brooks PC, Vary CP (2011) Endoglin regulates cancer-stromal cell interactions in prostate tumors. *Cancer Res* 71: 3482-3493.
26. Al-Rakan MA, Colak D, Hendrayani SF, Al-Bakheet A, Al-Mohanna FH, Kaya N, Al-Malik O, Aboussekhra A (2013) Breast stromal fibroblasts from histologically normal surgical margins are pro-carcinogenic. *J Pathol* 231: 457-465.
27. Papatheodorou H, Papanastasiou AD, Sirinian C, Scopa C, Kalofonos HP, Leotsinidis M, Papadaki H (2014) Expression patterns of SDF1/CXCR4 in human invasive breast carcinoma and adjacent normal stroma: Correlation with tumor clinicopathological parameters and patient survival. *Pathol Res Pract* doi: 10.1016/j.prp.2014.06.015.
28. Potter SM, Dwyer RM, Hartmann MC, Khan S, Boyle MP, Curran CE, Kerin MJ (2012) Influence of stromal-epithelial interactions on breast cancer in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 131: 401-411.
29. Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlincho S, Boissiere F, Laune D, Roques S, Lazenec G (2007) Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res* 9: R15.
30. Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, Matsushima K (2000) Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 6: 3282-3289.
31. Fujimoto H, Sangai T, Ishii G, Ikehara A, Nagashima T, Miyazaki M, Ochiai A (2009) Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression. *Int J Cancer* 125: 1276-1284.
32. Lebrecht A, Grimm C, Lantzscht T, Ludwig E, Hefler L, Ulbrich E, Koelbl H (2004) Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients with breast cancer. *Tumour Biol* 25: 14-17.
33. Hembruff SL, Jokar I, Yang L, Cheng N (2010) Loss of transforming growth factor-beta signaling in mammary fibroblasts enhances CCL2 secretion to promote mammary tumor progression through macrophage-dependent and -independent mechanisms. *Neoplasia* 12: 425-433.

34. Kimberley FC, Screaton GR (2004) Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* 14: 359-372.
35. Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, Micheau O (2006) Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 26: 7046-7055.
36. Esposito M, Kang Y (2014) Targeting tumor-stromal interactions in bone metastasis. *Pharmacol Ther* 141: 222-233.
37. Fang WB, Jokar I, Zou A, Lambert D, Dendukuri P, Cheng N (2012) CCL2/CCR2 chemokine signaling coordinates survival and motility of breast cancer cells through Smad3 protein- and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 287: 36593-36608.
38. Soria G, Ben-Baruch A (2008) The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett* 267: 271-285.

ABSTRACT

We investigate and define the potential role of α -SMA, FSP, CD105, CD146 in spindle-shaped stromal cells (SC), not associated with vasculature, of OPG, TRAIL, RANKL, SDF-1, IL-6, M-CSF, CCL-2, and their receptors in tumor epithelial cells (TEpC) and SC and of the ligands in SC in tumor samples of breast cancer patients (BCP) in early stage as predictive markers of poor clinical outcome. High expression of CD105 in CD34 negative-tumour stromal cells with spindle shape, not associated with vasculature, were associated with disease-free survival (DFS), metastasis-free survival (MFS), skeletal metastasis-free survival (SMFS), local relapse-free survival (LRFS) and overall survival (OS). Moreover, high expression of TRAIL-R3 and CCR-2 in TEpC was associated with DFS, MFS, SMFS and OS. Even more, the multivariate analysis suggests that the high CD105 expression in CD34 negative-tumour stromal cells with spindle shape, not associated with vasculature, and CCR-2 in TEpC was independent markers of unfavourable prognosis in early breast cancer patients. The evaluation of predictive factors of metastasis would allow us to distinguish early BCP with high risk of poor clinical outcome.

COINFECCIÓN HIV-HEPATITIS C: ROL DE LA INMUNIDAD CELULAR ESPECÍFICA EN LA RESPUESTA A LA TERAPIA BASADA EN INTERFERÓN ALFA-PEGILADO

Dra. Natalia L. Laufer

Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS,
ex Centro Nacional de Referencia para el SIDA)

La infección por virus de la hepatitis C (HCV) afecta a 170 millones de individuos a nivel mundial⁽¹⁾ y es una causa frecuente de hepatitis crónica, que puede progresar a cirrosis y hepatocarcinoma. Por otra parte se estima que 37 millones de personas viven con HIV/SIDA⁽²⁾. Como consecuencia de compartir las mismas vías de transmisión, se calcula que alrededor de 4-5 millones de personas se encuentran coinfectadas por HIV y HCV⁽³⁾.

Hasta el año 2011 el tratamiento de elección se basaba en la coadministración de interferón alfa pegilado (peg-IFN) y ribavirina (RBV) con tasas de éxito globales en pacientes coinfectados de sólo 40%, además este tratamiento presentaba importantes efectos adversos e interacciones con distintas drogas antirretrovirales^(4,5). En 2011 se incorporaron a este tratamiento las primeras drogas de acción directa contra el HCV, los inhibidores de la proteasa del HCV, boceprevir y telaprevir. Lo cual conllevó un aumento sustancial de las tasas de respuesta. Desde 2014 con la aprobación de nuevos antivirales de acción directa, inhibidores de la polimerasa, de NS5A, e inhibidores de la proteasa de segunda generación, se establecieron como tratamientos de elección combinaciones de estos antivirales (esquemas libres de interferón) con tasas de curación superiores al 90%⁽⁶⁾. Sin embargo, el alto costo de estas drogas de acción directa y las diferentes prioridades de salud pública en diferentes regiones del mundo han generado un fuerte debate sobre el acceso a los nuevos tratamientos, particularmente en países de bajos recursos⁽⁷⁾. En muchas regiones, las drogas de acción directa se restringen para los pacientes con mayores grados de fibrosis hepática (F3 y F4 de la escala METAVIR)⁽⁸⁾. Esta estrategia puede llevar, a un aumento en el tiempo, de la morbilidad asociada a la infección por HCV. Por lo cual es crucial identificar a los pacientes que no presentan grados avanzados de enfermedad hepática pero presentan un riesgo eleva-

do de progresión de la misma y consecuentemente se beneficiarían de un tratamiento más temprano.

Dados los cambios enumerados anteriormente en el contexto del tratamiento de la infección por HCV tanto en pacientes mono infectados por HCV como coinfectados por HIV/HCV, se dividió el proyecto en dos etapas diferentes.

Durante la primera etapa se estudió la respuesta inmune celular (TCD4+ y TCD8+) específica anti-HCV en sangre periférica ante la terapia y el fenotipo de las células NK pre y post instauración del tratamiento anti-HCV basado en peg-IFN/RBV. Los resultados de dichos estudios fueron presentados en el XIII Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología⁽⁹⁾.

Luego de haber puesto a punto el ensayo para la marcación de TRAIL en superficie de células NK obtenidas de células mononucleares de sangre periférica, se realizaron las marcaciones de fenotipo de células NK de 20 pacientes, divididos según respuesta al tratamiento. En dichas marcaciones se observó un mayor porcentaje de células NK CD56 bright en el grupo de pacientes coinfectados por HIV/HCV que respondieron al tratamiento (G1) que en aquellos que no respondieron (G2). La media del porcentaje de células CD56 bright fue 49,9 % (SD 13.8) en muestras de pacientes respondedores y de 26,2% (SD 13,6%) en sujetos no respondedores, $p=0,02$. No se encontraron diferencia significativas en el nivel de LT CD4 (G1:677 cél/mL-SD 531-; G2: 531 cél/mL-SD 193-. $p=0.87$); genotipo 1 de HCV (G1 80%, G2 70%, $p=0,67$); carga viral basal de HCV (G1:1x10⁷ UI/mL-SD 1.2x10⁷-, G2:6.5x10⁶ UI/mL -SD 9x10⁶-, $p=0.49$) (Tablas 1,2)

Los resultados obtenidos demuestran un rol relevante de TRAIL en la respuesta al tratamiento con peg-IFN-a y RBV. Sin embargo desde la incorporación de las drogas de acción directa contra HCV con las elevadas tasas de respuesta para todos los genotipos, los investigadores que participamos de este proyecto consideramos relevante modificar el enfoque de nuestra investigación. Se describe a continuación el plan de trabajo de la segunda etapa.

La fibrosis hepática por acumulación anormal de matriz extracelular es uno de los principales problemas en el paciente con HCV, siendo las células estrelladas hepáticas (CHE) primariamente responsable del daño patológico al hígado⁽⁹⁾. Las células NK constituyen la mayoría de las células de la inmunidad innata en los hígados humanos sanos^(10,11) y se ha demostrado que regulan negativamente la fibrosis hepática en ratones.^(11,12) Las células NK promueven la muerte o inactivación de las CHE a través de TRAIL (tumor necrosis factor-related ligand) e IFN- γ ⁽¹³⁾. Asimismo, células NK aisladas de pacientes infectados con HCV inducen la apoptosis de CHE activadas vía

Tabla 1 Diferencias en la expresión en superficie de NK CD56 *bright* entre pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento

	R media ± DE	NR media ± DE	p
CD56 bright TRAIL	49.9 ± 13.8	26.2 ± 13.6	0.02

Tabla 2 Características basales de los pacientes incluidos

	Respuesta	No respuesta	p
LTCD4+ cell/μL *	677 ± 531	531 ± 193	0.87
Genotipo 1 %	80	70	0.67
Carga viral HCV log*	1x10 ⁷ ± 1.2x10 ⁶	6.5x10 ⁶ ± 9x10 ⁶	0.49
Hombres %	100	100	>0.05

* Media ± DE

TRAIL, FasL, y NKG2D⁽¹⁴⁾ y células NK caracterizadas como NKp46alto tienen el potencial de suprimir la replicación del HCV y el daño hepático asociado⁽¹⁵⁾. Por ello, las células NK hepáticas juegan un rol anti-fibrótico crucial a través de su interacción con CHE. Además, las células T CD4+ regulan la actividad de otras células inmunocompetentes⁽¹⁶⁾ entre las que están las células NK⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Consecuentemente, la depleción de células T CD4+ característica de la infección por HIV podría afectar negativamente la capacidad anti-fibrótica de las células NK, lo que explica la relación existente entre el recuento de células CD4+ y el estadio de fibrosis hepática⁽²⁰⁾. Por otro lado, células NK de pacientes coinfectados por HIV/HCV son menos sensibles a la estimulación por linfocitos T CD4+ que las obtenidas de pacientes mono infectados con HCV, lo cual sugiere que existiría además una desregulación de las células NK en los pacientes coinfectados.

Estos datos sustentan la búsqueda de los biomarcadores propuestos en el compartimiento NK de sangre periférica de los pacientes. Por lo tanto para la segunda etapa del proyecto se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudiar el fenotipo de las células NK de sangre periférica (SP) de pacientes co-infectados con HIV/HCV, mono infectados con HCV y donantes sanos.

2. Determinar la capacidad citotóxica y de secreción de IFN- γ de las células NK de los diferentes grupos de pacientes y controles sanos.
3. Correlacionar el fenotipo y la respuesta funcional de las células NK de SP de los grupos de pacientes con los diferentes grados de fibrosis hepática.

Se realizaron las siguientes marcaciones de superficie de células NK para este estudio:

a) células NK totales (células CD3-CD56+), **b)** subpoblaciones CD56dim y CD56bright, **c)** células NK con fenotipo de diferenciación terminal (CD57+), **d)** células NK con fenotipo activado (CD25+ o CD69+), **e)** expresión de receptores activadores (NKp30, NKp46, NKG2D, DNAM-1, CD94/NKG2C) e inhibidores (CD94/NKG2A); **f)** expresión de perforina y receptores de muerte celular (FasL, TRAIL); y **g)** expresión de marcadores que determinan migración a órganos linfoides secundarios (CD62L y CCR7).

Los resultados fueron presentados en el XV Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología^[21].

Se tomaron muestras de 8 pacientes sin tratamiento para HCV, coinfectados por HIV bajo tratamiento antirretroviral efectivo. Se agrupó a los pacientes según el grado de fibrosis hepática reportado por biopsia o elastografía hepática transitoria: G1 quienes presentaban un score de METAVIR F0-F2 (n=4) y G2: METAVIR F3-F4 (n=4). Se separaron células mononucleares de sangre periférica que fueron almacenadas en nitrógeno hasta su uso. Se realizó la marcación de superficie con los siguientes anticuerpos: NKp30-PE, CCR7-PE, CD94-FITC, CD25-PE, NKG2D-APC, CD69-FITC, CD69-FITC, DNAM-1-FITC, CD3-APC/Cy7, CD57-APC, CD62L-PE/Cy7, NKp46-PE/Cy7, FasL-PE todos de BioLegend y CD56-PE/Cy5 de BD. Se utilizaron sus correspondientes controles de isotipo. Se definieron células NK como CD3-CD56+, y se las dividió en NKCD56bright y CD56dim según la intensidad de expresión de CD56 en superficie. Los datos fueron analizados utilizando el programa FlowJo (Ashland, Oregon, USA). Análisis estadístico: Kruskal Wallis Test (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.)

En las muestras de pacientes del grupo G1 se observó un mayor porcentaje de células NK totales ($p=0,02$) y % de expresión de TRAIL (CD253) en las NK CD56bright ($p=0,001$) que en los pacientes del grupo G2. Por otro

lado se observó una menor expresión en superficie de CD69 en células NK CD56bright y de Nkp30 en las NK CD56dim de los pacientes del grupo G1 con respecto al grupo G2 ($p=0,04$) (Figura 1 y Tabla 3).

Figura 1

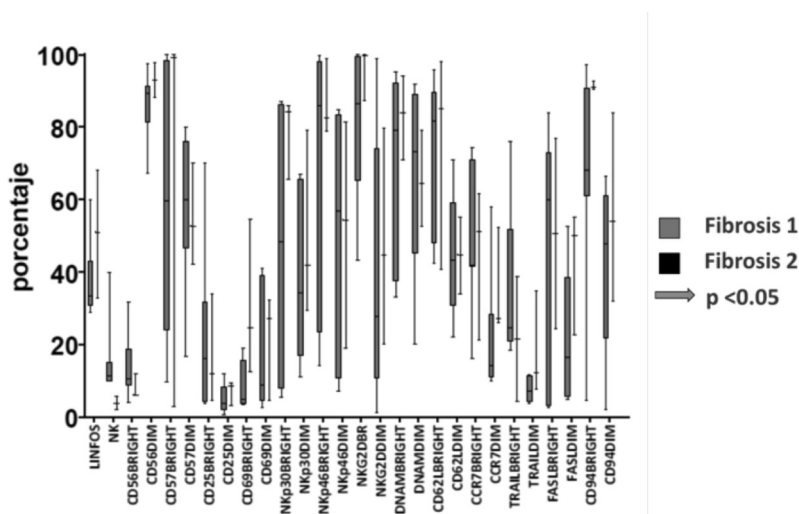


Tabla 3

Variable	Nivel de fibrosis	MEDIA	DE	p
CD4	F0-F2	820,60	234,052	0.05
(células/mcL)	F3-F4	432,33	171,471	
Años infección por HCV	F0-F2	9,2000	4,65833	0.22
(años)	F3-F4	6,0000	3,46410	
Años infección por HIV	F0-F2	15,2000	6,09918	1,00
(años)	F3-F4	17,0000	2,64575	
Niveles de TGP	F0-F2	55,80	28,934	0,10
(UI/mL)	F3-F4	114,00	63,024	

Los mayores porcentajes de células NK y expresión de TRAIL (asociado a mayor citotoxicidad) observados en las muestras de pacientes con menor

fibrosis hepática (F0-F2) se podrían correlacionar con un mayor control por parte de esta población de células mononucleares sobre las estrelladas hepáticas. Los pacientes que no presenten dicho fenotipo de sus células NK podrían ser individuos con una progresión más rápida y en quienes podría ser prioritario el inicio del tratamiento para su infección crónica por HCV. De confirmarse en una muestra poblacional más grande estos resultados se podría utilizar la evaluación del fenotipo de células NK como predictores de mayor lesión hepática y como indicadores de la necesidad de inicio temprano del tratamiento específico.

REFERENCIAS

1. Lavanchy, D., *The global burden of hepatitis C*. Liver Int, 2009. **29** Suppl 1: p. 74-81.
2. UNAIDS. *AIDS by the numbers 2015*. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS_by_the_numbers_2015_en.pdf.
3. Alter, M.J., *Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection*. J Hepatol, 2006. **44**(1 Suppl): p. S6-9.
4. Fried, M.W., et al., *Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 2002. **347**(13): p. 975-82.
5. Soriano, V., et al., *Care of patients coinfectd with HIV and hepatitis C virus: 2007 updated recommendations from the HCV-HIV International Panel*. AIDS, 2007. **21**(9): p. 1073-89.
6. *EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015*. J Hepatol, 2015. **63**(1): p. 199-236.
7. Zoulim, F., et al., *Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies*. Gut, 2015. **64**(11): p. 1824-33.
8. American Association for the Study of Liver Diseases/Infectious Diseases Society of America /International AIDS Society–USA. *When and in whom to initiate HCV therapy*. 2014. Available at: <http://www.hcvguidelines.org/node/91>. Accessed 5 April 2015.
9. Laufer, N et al. "La expresión de TRAIL en la superficie células Natural Killer se asocia con la respuesta a interferón pegilado en pacientes coinfectados por HIV/ HCV". XIII Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología – SADI 2013. Junio 2013, Mar del Plata.
10. Norris, S., et al., *Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes*. J Hepatol, 1998. **28**(1): p. 84-90.
11. Radaeva, S., et al., *Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners*. Gastroenterology, 2006. **130**(2): p. 435-52.
12. Melhem, A., et al., *Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC*. J Hepatol, 2006. **45**(1): p. 60-71.

13. Jeong, W.I., et al., *STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity*. Hepatology, 2006. **44**(6): p. 1441-51.
14. Glassner, A., et al., *NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner*. Lab Invest, 2012. **92**(7): p. 967-77.
15. Kramer, B., et al., *Natural killer p46High expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis*. Hepatology, 2012. **56**(4): p. 1201-13.
16. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
17. Fehniger, T.A., et al., *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. Blood, 2003. **101**(8): p. 3052-7.
18. Horowitz, A., et al., *NK cells as effectors of acquired immune responses: effector CD4+ T cell-dependent activation of NK cells following vaccination*. J Immunol, 2010. **185**(5): p. 2808-18.
19. Horowitz, A., et al., *Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 6043-52.
20. Schiavini, M., et al., *Fibrosis progression in paired liver biopsies from HIV/HCV co-infected patients*. Hepat Mon, 2011. **11**(7): p. 525-31.
21. Laufer, N et al. "Fenotipo y funcionalidad de células NK de sangre periférica como predictores de fibrosis hepática en pacientes coinfectados por HCV/HIV". XV Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología – SADI 2015. Mayo 2015, CABA.

ABSTRACT

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection affects 170 million individuals worldwide and is a common cause of chronic hepatitis, which may progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma whereas currently 34 million people are living with HIV/AIDS (PLWHA)⁽¹⁰¹⁾. Because of overlapping pathways of transmission approximately 4-5 million individuals worldwide are estimated to be co-infected with both viruses.

Direct antiviral agents are a major development in the treatment of HCV infection, with the possibility of more than 90% of cure. However, the high cost of DAA regimens and competing public health priorities have prompted a worldwide discussion whether all patients should have access to the new therapies without restriction. In many countries, new DAA regimens are therefore reserved for patients with advanced fibrosis or cirrhosis, only. Thus, it is crucial to identify patients at early disease stages but high risk of fibrosis

progression who would consequently require urgent HCV treatment. We identified that patients with higher grades of liver fibrosis exhibited lower natural killer cell counts and surface expression of TRAIL. These two parameters could be used as potential markers of higher risk of fibrosis progression with the consequent priority to received HCV treatment.

MARCADORES SEROLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS

Silvia A. Longhi

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular

RESUMEN

La OMS ha establecido como prioridad de investigación en la enfermedad de Chagas, la búsqueda de biomarcadores serológicos, como herramientas de laboratorio para determinar la eficacia del tratamiento a plazos más cortos que la serología convencional, y de biomarcadores que permitan pronosticar la progresión a la cardiopatía chagásica crónica (CCC).

Recientemente, se demostró que la proteína asociada a pancreatitis (PAP-1) presenta un mayor nivel de expresión en cardiomiocitos de rata con miocarditis autoinmune experimental en comparación con cardiomiocitos sin miocarditis, y además, se halló que pacientes con insuficiencia cardíaca presentan valores elevados en sangre. Con el propósito de determinar si el dosaje de PAP-1 en suero puede ser un marcador de daño cardíaco, se analizaron 106 muestras de pacientes con enfermedad de Chagas que presentan diferentes formas clínicas de la enfermedad. Los resultados mostraron que en pacientes con CCC, clasificación NYHA I-II, presentaron valores de PAP-1 similares a los individuos sanos, a los pacientes asintomáticos y a los pacientes digestivos. Sin embargo, en los pacientes con clasificación funcional III-IV, el valor de PAP-1 fue significativamente mayor en comparación a los individuos sanos ($43,7 \pm 25,2$ ng/ml vs $10,1 \pm 5,4$ ng/ml; $p < 0,001$), con pacientes asintomáticos ($43,7 \pm 25,2$ ng/ml vs $13,0 \pm 7,6$ ng/ml; $p < 0,01$) así como también con pacientes con CCC/NYHA I-II ($43,7 \pm 25,2$ ng/ml vs $11,5 \pm 9,3$ ng/ml; $p < 0,001$). Al comparar los resultados obtenidos en muestras de pacientes con miocardiopatía dilatada no isquémica/NYHA III-IV con el grupo con CCC/NYHA III-IV se observó que el valor medio de PAP-1 no fue significativamente diferente ($23,0 \pm 10,5$ ng/ml vs $43,7 \pm 25,2$ ng/ml), lo cual indica que PAP-1 está asociada al daño cardíaco. En conclusión, PAP-1 podría ser utilizado como marcador de daño cardíaco así como también un

marcador de progresión hacia formas más severas de la enfermedad de Chagas.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, causada por la infección con el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*, es una de las principales causas de miocarditis aguda y miocardiopatía crónica que se observa en América Latina. Debido a la migración, esta infección es un importante problema de salud humana, porque se está extendiendo a Europa, América del Norte, Japón y Australia⁽¹⁻³⁾. Durante la fase aguda, el corazón infectado se caracteriza por la infección activa, la inflamación y el daño tisular; aunque, no hay síntomas en el período asintomático subsiguiente⁽⁴⁾. Sin embargo, aproximadamente el 30-40% de los individuos infectados, varios años después de la exposición inicial, desarrollan síntomas clínicos como lesiones cardíacas y / o alteraciones digestivas⁽⁵⁾. La miocardiopatía chagásica crónica (CCC) se manifiesta como una miocardiopatía dilatada e incluye arritmias auriculoventricular, trastornos de la conducción intraventricular, aneurismas apicales, cardiomegalia e insuficiencia cardíaca. Los pacientes con insuficiencia cardíaca tienen una esperanza de vida reducida a unos pocos años y sus autopsias muestran una marcada dilatación de todas las cámaras cardíacas⁽⁴⁾. En este estado funcional, una variedad de sistemas de péptidos se activan tales como el sistema renina-angiotensina y del sistema de péptido natriurético cardíaco. Un aumento significativo los niveles del péptido natriurético tipo B (BNP) y del péptido natriurético atrial (ANP),⁽⁶⁻⁹⁾ han sido detectados en pacientes con enfermedad de Chagas así como también en pacientes con otros tipos de miocardiopatía dilatada. Tanto ANP y BNP se han utilizado como marcadores moleculares potentes en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad de Chagas.

La proteína asociada a la pancreatitis 1 (PAP-1) es una proteína secretora pancreática de 16,6 kDa que pertenece al grupo VII de la familia de lectina tipo C. Aunque, originalmente PAP-1 se describió en el páncreas, su expresión se ha observado en una variedad de tejidos, incluyendo las células epiteliales del intestino delgado⁽¹⁰⁾, riñón⁽¹¹⁾, y el útero⁽¹²⁾ en respuesta al estrés o a inflamación externa. El papel fisiológico de PAP-1 aún no está bien entendido, pero se han sugerido varias funciones. Algunos datos apoyan que PAP-1 juega un efecto protector contra el daño inflamatorio, en la regeneración de tejidos y la proliferación celular^(13,14). Además, en un modelo de rata de la mio-

carditis, se observó un incremento en la expresión de los genes de la familia PAP/ Reg2, lo cual sugiere un papel importante de estas proteínas en la miocarditis⁽¹⁵⁾. Recientemente, se ha demostrado que los niveles de PAP-1 están aumentados en pacientes con insuficiencia cardíaca y su concentración se correlaciona con los síntomas y los niveles de BNP, siendo probablemente un marcador de pronóstico para la gravedad de la enfermedad⁽¹⁶⁾.

En la enfermedad de Chagas, es importante identificar aquellos pacientes que cursan la fase crónica asintomática y tengan riesgo de progresar a la miocardiopatía o pacientes que, a pesar de permanecer asintomáticos, tienen una cardiopatía incipiente, que requiere de un estricto seguimiento. El objetivo de este estudio fue evaluar los niveles de PAP-1 en muestras de suero de pacientes con diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas. Los resultados mostraron que los niveles séricos de PAP-1 se encuentran significativamente elevados en los pacientes con daño cardíaco severo, respecto a los pacientes que presentan otras formas clínicas, como los pacientes asintomáticos o con cardiopatía moderada (con clasificación de NYHA I/II).

PACIENTES Y MÉTODOS

Para este estudio se incluyeron 106 muestras de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas con diferente grado de compromiso de la enfermedad. Las muestras de los pacientes asintomáticos y cardiopatas fueron obtenidas en los siguientes centros hospitalarios: Instituto Fátala Chabén, Hospital Ramos Mejía y Fundación Favaloro. Las muestras de pacientes con Chagas digestivo provienen de Brasil y fueron cedidas por la Dra. Eliane Lages. Como grupos control, se incluyeron 11 muestras de sueros de pacientes con cardiopatías dilatada no chagásica y de 22 individuos sanos con serología negativa para la enfermedad de Chagas y sin problemas cardíacos.

Los valores de PAP-1 en las muestras de sueros se midieron utilizando el Kit comercial de Dynabio S.A., siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California). Se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis con pruebas post hoc de Dunn para comparar variables continuas no gaussianas. La correlación con los parámetros clínicos y de laboratorio se realizó mediante correlación de Spearman. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La búsqueda de biomarcadores serológicos es una prioridad de la investigación en Chagas, según se ha reconocido en una reunión de expertos de la Organización Mundial de la Salud ⁽³⁾. Sin embargo, es muy escasa y controvertida la información sobre biomarcadores serológicos para monitorear y pronosticar la progresión desde la fase asintomática a la fase crónica con manifestaciones cardíacas, para predecir el riesgo de reactivación chagásica en pacientes inmunosuprimidos sometidos a transplante de órganos o para determinar la eficacia del tratamiento a plazos más cortos que la serología convencional. Como se mencionó en la introducción, la proteína asociada a pancreatitis (PAP-1) presenta un mayor nivel de expresión en cardiomiocitos de rata con miocarditis autoinmune experimental⁽¹⁵⁾ y en pacientes con insuficiencia cardíaca, el aumento de la expresión de PAP-1 se correlacionó con los niveles de expresión de la interleuquina-6 y con falla cardíaca⁽¹⁶⁾.

Con el propósito de establecer si la concentración de PAP-1 se correlaciona con el progreso de la enfermedad de Chagas desde la fase asintomática a la CCC, se midió la proteína en muestras de pacientes pertenecientes a diferentes grupos clínicos que se detallan en la Tabla 1.

TABLA 1: Características clínicas de los pacientes

	Serología	Clasificación NYHA	N° de Individuos
Ch Asintomático	positiva	-	22
Ch Digestivo	positiva	-	12
CCC	positiva	I/II	60
CCC	positiva	III/IV	12
Ind Sano	negativa	-	22
MCD	negativa	III/IV	11

Ch: Chagas, **CCC:** Cardiopatía Chagásica Crónica; **Ind Sano:** Individuo Sano; **MCD:** Miocardiopatía dilatada no isquémica; **Clasificación NYHA:** Clasificación funcional de la New York Heart Association

Para la medición de PAP-1 en los sueros de los pacientes, decidimos utilizar kits comerciales que garantizan reproducibilidad y especificidad de los resultados. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1 y el análisis estadístico en la Tabla 2.

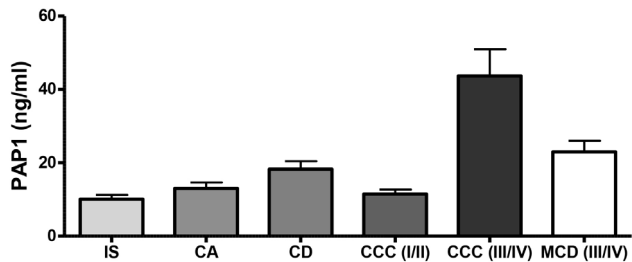


Figura 1: Determinación de la concentración de PAP-1 sérica. La concentración de la proteína PAP-1 se midió por ELISA utilizando el kit comercial Pancreapap de Dynabio. IS: Individuos sano; CA: Chagas Asintomático; CD: Chagas Digestivo; CCC: Cardiopatía chagásica crónica. MCD: Miocardiopatía dilatada no isquémica; I/II/III/IV: Clasificación de NYHA.

TABLA 2: Análisis estadístico

Prueba de Dunn de Comparación Múltiple	p<
Ind Sanos vs Ch Asintomático	NS
Ind Sanos vs Ch Digestivo	NS
Ind Sanos vs CCC NYHA I/II	NS
Ind Sanos vs CCC NYHA III/IV	0,001
Ch Asintomático vs CCC NYHA I/II	NS
Ch Asintomático vs CCC NYHA III/IV	NS
Ch Digestivo vs CCC NYHA III/IV	0.001
CCC NYHA III/IV vs MCD NYHA III/IV	NS

Ch Asintomático: Chagas Asintomático; **Ch Digestivo:** Chagas Digestivo; **CCC:** Cardiopatía Chagásica Crónica; **Ind Sano:** Individuo Sano; **MCD:** Miocardiopatía dilatada no isquémica, **NS:** No Significativo

Los niveles séricos de PAP-1 presentaron valores similares entre los individuos sanos y los pacientes con Chagas Asintomático, con Chagas Digestivo o CCC NYHA I/II. En cambio, la concentración en suero de PAP-1 fue significativamente elevados en pacientes con CCC NYHA III/IV en comparación con los pacientes con Chagas Asintomático, CCC NYHA I/II y con los individuos sanos.

Si bien el valor obtenido para los pacientes con CCC NYHA III/IV no fue significativamente distinto a los pacientes con MCD NYHA III/IV, los cuales también manifiestan falla cardíaca, en los pacientes con enfermedad de Chagas la concentración de PAP-1 se correlacionaría con la gravedad de la patología chagásica (Figura 2).

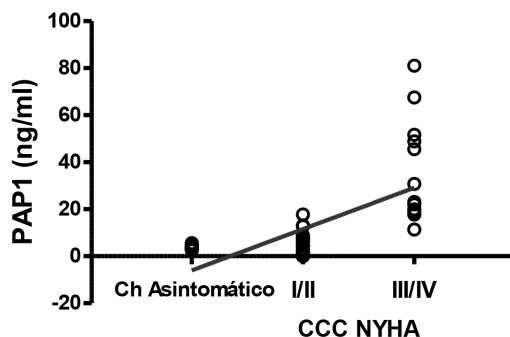


Figura 2: Correlación entre los niveles de PAP-1 y los distintos estadios clínicos. Se analizaron los pacientes correspondientes a los grupos clínicos señalados. El aumento de la concentración de PAP-1 se correlaciona con la gravedad de la patología chagásica (Correlación de Spearman, $r: 0.62$; IC95%: 0.40 a 0.77; $p < 0.0001$)

CONCLUSIÓN

PAP-1 podría ser un nuevo marcador de pronóstico que merece un estudio prospectivo en una cohorte mayor de pacientes con enfermedad de Chagas, en la configuración de agudos, indeterminados y crónicos, ya que sería interesante analizar si se encuentra una cohorte de paciente asintomáticos con valores altos de PAP-1, que luego de un seguimiento en el tiempo desarrollen una patología crónica.

AGRADECIMIENTO

A la Fundación “Alberto J. Roemmers” por financiar el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, 2009, 104: 17-30.
2. Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 2010, 465: 56-57.
3. World Health Organization. Chagas disease: control and elimination. UNDP/World Bank/WHO. 2010. Available: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_17-en.pdf. (Accessed 2011 Nov 9)
4. Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc. Res.*, 2003, 60: 96e107.
5. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*, 2010, 375: 1388-1402.
6. Berger R, Huelsman M, Strecker K, Bojic A, Moser P, Stanek B, Pacher R. B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 2002, 105:2392e7.
7. Walther T, Heringer-Walther S, Wessel N, Schultheiss HP, Moreira Mda C. Brain natriuretic peptide as a predictor of cardiomyopathy in Chagas' disease. *Lancet*, 2003, 361:1567.
8. Heringer-Walther S, Moreira MC, Wessel N, Saliba JL, Silvia-Barra J, Pena JL, Becker S, Siems WE, Schultheiss HP, Walther T. Brain natriuretic peptide predicts survival in Chagas' disease more effectively than atrial natriuretic peptide. *Heart*, 2005, 91:385e7.
9. Heringer-Walther S, Moreira Mda C, Wessel N, Wang Y, Ventura TM, Schultheiss HP, Walther T. Does the C-type natriuretic peptide have prognostic value in chagas disease and other dilated cardiomyopathies? *J Cardiovasc. Pharmacol.*, 2006, 48:293e8.
10. Iovanna JL, Keim V, Bosshard A, Orelle B, Frigerio JM, Dusetti N, Dagorn JC. PAP, a pancreatic secretory protein induced during acute pancreatitis, is expressed in rat intestine. *Am. J. Physiol.*, 1993, 265: G611-G618.
11. Chakraborty C, Sharma S, Katsumata N, Murphy L.J, Schroedter I-C, Robertson M., Shiu RP, Friesen HG. Plasma clearance, tissue uptake and expression of pituitary peptide 23/pancreatitis-associated protein in the rat. *J. Endocrinol.* 1995, 145: 461-469.
12. Chakraborty C, Vrontakis M, Molnar P, Schroedter IC, Katsumata N, Murphy L J, Shiu RP, Friesen HG. Expression of pituitary peptide 23 in the rat uterus: regulation by estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1995, 108: 149-154.
13. Simon MT, Pauloin A, Normand G, Lieu HT, Mouly H, Pivert G, Carnot F, Tralhao JG, Brechot C, Christa L. HIP/PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and antiapoptotic functions through the PKA signaling pathway. *FASEB J.*, 2003, 17: 1441-1450.
14. Christa L, Simon MT, Brezault-Bonnet C, Bonte E, Carnot F, Zylberberg H, Franco D, Capron F, Roskams T, Brechot C. Hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pan-

- creatic associated protein (HIP/PAP) is expressed and secreted by proliferating ductules as well as by hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma cells. *Am. J. Pathol.*, 1999, 155: 1525–1533.
15. Watanabe R, Hanawa H, Yoshida T, Ito M, Isoda M, Chang H, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Ding L, Hao K, Kato K, Kodama M, Aizawa Y. Gene expression profiles of cardiomyocytes in rat autoimmune myocarditis by DNA microarray and increase of regenerating gene family. *Transl. Research*, 2008, 152:119.
 16. Fitzgibbons TP, Paolino J, Dagorn JC, Meyer TE. Usefulness of Pancreatitis-Associated protein, a novel biomarker, to predict severity of disease in ambulatory patients with heart failure. *Am J Cardiol.*, 2014, 113: 123-126.

ABSTRACT

World Health Organization has prioritized research on Chagas disease, finding serological biomarkers as laboratory tools to determine the effectiveness of treatment at shorter term than conventional serology and as biomarkers that predict progression to chronic Chagas disease (CCC).

Recently, it was shown that Pancreatitis-Associated Protein-1 (PAP-1) has a higher level of expression in rat cardiomyocytes with experimental autoimmune myocarditis compared cardiomyocytes without myocarditis, and further found that patients with heart failure have elevated levels of PAP-1 in blood. In order to determine if the PAP-1 levels may be a marker of heart damage, 106 patients with Chagas' disease, who have different clinical forms of the disease, were analyzed. The results showed that in patients with CCC, NYHA classification I-II, have values of PAP-1 similar to healthy individuals, asymptomatic patients or digestive patients. However, in patients with functional classification III-IV, the value of PAP-1 was significantly higher compared to healthy individuals (43.7 ± 25.2 ng/ml vs 10.1 ± 5.4 ng/ml; $p < 0.001$), to asymptomatic patients (43.7 ± 25.2 ng/ml vs 13.0 ± 7.6 ng/ml; $p < 0.01$) as well as to CCC/NYHA I-II patients (43.7 ± 25.2 ng/ml vs 11.5 ± 9.3 ng/ml; $p < 0.001$). By comparing the results obtained in samples from patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy /NYHA III-IV with CCC/NYHA III-IV group, was found that the average value of PAP-1 was not significantly different ($23.0 \pm 10, 5$ ng/ml vs 43.7 ± 25.2 ng/ml), which shows that PAP-1 is associated with heart damage. In conclusion, PAP-1 could be used as a marker of heart failure as well as a marker of progression to more severe forms of Chagas' disease.

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE VITAMINA D EN MUJERES POSMENOPÁUSICAS

Ana M. Masoni, Inés Menoyo, Gonzalo S. Morosano, Roberto Bocanera ,
Stella M. Pezzotto, Mario E. Morosano.

Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR
y Hospital Provincial del Centenario.

RESUMEN

Dada la relevancia de la vitamina D en el control homeostático del metabolismo del calcio y como modulador de los procesos de diferenciación y proliferación celular, resulta importante conocer los niveles circulantes de la misma en pacientes considerados en riesgo, con el fin de desarrollar estrategias de prevención de diversas patologías vinculadas a su déficit. En este trabajo se estudiaron 55 pacientes posmenopáusicas sin antecedentes de tratamiento con fármacos osteo-activos o corticoides, concurrentes habituales al Consultorio de Osteopatías de la Sección de Climaterio del Servicio de Ginecología del Hospital Provincial del Centenario. Se realizó anamnesis, examen físico, cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos con el objeto de estimar la ingesta diaria de Calcio y cuestionario de actividad laboral, recreativa y deportiva, para estimar la actividad física diaria. Además, se les realizaron dosajes de 25(OH)D y PTH y DXA de cadera. Más del 80% de las pacientes de la muestra presentaron niveles inapropiados de 25(OH)D. El nivel promedio de 25(OH)D se encontró en el rango de insuficiencia (<30 ng/ml). No obstante, el valor promedio de PTH se halló dentro del rango normal. En cuanto a la DMO de cadera, el valor promedio se halló dentro del rango correspondiente a osteopenia. Se observó una asociación de tipo logarítmica entre la PTH sérica y el estado de Vitamina D que resultó estadísticamente significativa ($p=0,01$).

Las observaciones realizadas en el presente estudio con respecto a la elevada prevalencia de hipovitaminosis D, la relación inversa entre 25(OH)D y PTH, los antecedentes de fractura relacionados con baja DMO y la exposición solar que resulta insuficiente, estarían indicando que este grupo de pacientes constituye un grupo vulnerable para su salud ósea debido a los niveles subóptimos de vitamina D.

Palabras clave: Vitamina D. Parathormona. Posmenopausia. Hipovitaminosis D

ABSTRACT

Given the importance of vitamin D in calcium metabolism homeostatic control, as well as its role as differentiation and cell proliferation modulator, it is important to study its circulating level in patients considered at risk, in order to develop prevention strategies on conditions associated with its deficit. We studied 55 postmenopausal women with no history of osteo-active drug therapy or steroid drugs intake, attending to the Menopause Center at the Hospital Provincial del Centenario, Rosario, Argentina. A physical examination was performed, and a food consumption frequency questionnaire was applied in order to estimate daily calcium intake. To estimate daily physical exercise, work and sports activities were investigated. Serum Parathyroid hormone (PTH), and 25(OH)D were measured, and a hip DXA was done in every patient. An inappropriate level of 25(OH)D was observed in 80% of patients. The 25(OH)D average level was found within the insufficiency range (<30 ng/ml); and PTH average value fell within the normal range. Bone mineral density average value was found within the osteopenic range. A statistically significant logarithmic association was observed between serum PTH level and Vitamin D status ($p=0,01$).

The results of the present study concerning the high frequency of inappropriate concentrations of 25(OH) D, the inverse association between 25(OH)D and PTH, the fracture history, low BMD and insufficient sun exposure, would indicate that these postmenopausal women are part of a particular vulnerable group of patients considering its bone health, possibly due to their suboptimal levels of vitamin D.

Key words: Vitamin D. Parathormone. Post-menopause. Hypovitaminosis D

CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE SU UTILIDAD CLÍNICA

Julieta Maymó; Cecilia Varone

Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA- IQUIBICEN, CONICET

INTRODUCCIÓN

La placenta reviste un gran interés como fuente de células para la medicina regenerativa dada la plasticidad fenotípica de muchos de los tipos celulares aislados de este tejido. Más aún, la placenta, que está involucrada en mantener la tolerancia materno-fetal, contiene células que poseen características inmunomoduladoras. Estas dos propiedades podrían proveer herramientas útiles para aplicaciones clínicas basadas en la terapia con células, definiendo a ésta como el uso de células vivas para restaurar, mantener o incrementar la función de los tejidos y órganos. Los tejidos placentarios son fáciles de obtener, sin necesidad de procedimientos invasivos, proliferan rápidamente, se obtienen en gran masa y su uso no genera debates éticos, como con las células madre embrionarias (hESC). Publicaciones recientes indican que existen varios tipos de potenciales células madre derivadas de placenta humana, entre ellas, las células epiteliales del amnios (hAEC). Las hAECs expresan marcadores de células madre y poseen la capacidad de diferenciarse en los tres tipos de capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. Además, no se ha encontrado evidencia de tumorigenicidad en humanos en los casos en los que hAECs aisladas se trasplantaron en voluntarios. A diferencia de las hESCs, las hAECs no expresan telomerasa y no son tumorigénicas. Estas propiedades, el aislamiento sencillo y la fácil disponibilidad de la placenta, vuelven al amnios una fuente útil y no controversial de células para el trasplante y la medicina regenerativa.

El objetivo general de nuestro proyecto de investigación es el estudio de la placenta humana como fuente novedosa y de gran interés, de células madre con capacidad regenerativa de tejidos con distintas patologías.

En particular los objetivos para el presente tema de investigación son:

1. Aislamiento y caracterización de células epiteliales de membrana amniótica humana.
2. Estudio de los mecanismos celulares involucrados en la diferenciación de las hAECs, respecto a la proliferación celular y apoptosis. Estudio de los caminos de transducción de señales activados.

Como aplicación clínica a futuro, desarrollar una estrategia alternativa al trasplante de hígado en pacientes con patología hepática crónica que lo requiera.

RESULTADOS

En el presente trabajo hemos logrado implementar con éxito un protocolo específico de aislamiento de células epiteliales amnióticas humanas. Con este protocolo, se obtuvo en promedio un 63% de viabilidad celular y 22×10^7 células totales. Estas células fueron luego analizadas por citometría de flujo de manera de determinar la identidad y pureza de los cultivos. Los análisis de FACS reportaron una pureza cercana al 100% para las células epiteliales aisladas. Analizamos luego, por qRT-PCR la expresión de marcadores específicos de pluripotencia SOX-2, OCT-4 y NANOG, en las hAECs aisladas, luego de 24 h en medio de cultivo IMDM 10% SFB. Tal como esperábamos, las hAECs expresaron Oct-4, Sox-2 y Nanog, y dichos niveles disminuyeron progresivamente a medida que transcurrieron los días en cultivos. La expresión de los marcadores de pluripotencia indica la potencial capacidad de las células amnióticas para diferenciar a distintos tipos celulares. La disminución de los mismos a medida que transcurren los días podría deberse al inicio de algún proceso de diferenciación espontáneo, debido a factores no definidos que probablemente posea el suero empleado, o bien, a la falta de interacción de las células con su entorno fisiológico natural. Algunos autores afirman que el contacto entre las células madre y una monocapa “feeder-like” de células amnióticas epiteliales sería clave para mantener a las células madre como tales. Se ha descrito la supresión de genes de pluripotencia durante la expansión de las hAECs en suero fetal bovino, acompañado de cambios en el fenotipo y en los antígenos de superficie, lo cual sugiere una transición del fenotipo epitelial al mesenquimal. Por ello, es necesario tener en cuenta estos cambios al momento de considerar y evaluar el potencial terapéutico de estas células madre, ya que podría haber variaciones en el mismo.

Una vez caracterizadas las hAECs, procedimos a implementar un protocolo de diferenciación hepática, con factores específicos agregados al medio de cultivo, en puntos específicos del proceso. Asimismo, se analizó la diferenciación con el uso de un medio condicionado de células hepáticas HepG2. Por *qRT-PCR* determinamos que durante los primeros días del proceso de diferenciación, las hAECs disminuyen significativamente la expresión de los marcadores de pluripotencia SOX-2, OCT-4 y NANOG, con ambos protocolos de diferenciación. La desaparición de la expresión de dichos marcadores es necesaria para iniciar cualquier tipo de diferenciación. Asimismo, durante este proceso determinamos, por microscopia de campo claro, los cambios morfológicos ocurridos en las células. Hemos logrado adquirir fotografías durante 20 días del tratamiento. Las hAECs control en el día 1 de cultivo poseen una alta relación núcleo:citoplasma, una forma típicamente redondeada, burbujas citoplasmáticas y microvilli en superficie. Este microvilli es característico de células epiteliales. Con el transcurso de la diferenciación, las hAECs control, si bien individualmente mantuvieron su morfología característica, se observa la formación de colonias celulares, las cuales aumentaron su tamaño en proporción al tiempo en cultivo. En el caso del tratamiento con MC, al día 6 de cultivo, éste no produjo cambios evidentes en la morfología de las hAECs. Cuando se trató a las células con EGF, observamos el cambio en la morfología ya a los 6 días de cultivo, y dicho cambio se evidenció más aún con el transcurso de la diferenciación. Los cambios fueron progresando durante el proceso y la mayoría de las células tratadas adquirieron morfología hepática. A los 20 días, fue posible observar la morfología cuboide, típica de las células hepáticas, con abundantes gránulo en el citoplasma, los nucléolos distinguibles y la presencia de algunas células binucleadas. Además, observamos que las células diferenciadas poseían un diámetro similar a los hepatocitos control (HepG2) mantenidos en cultivo por el mismo tiempo.

Luego de haber analizado la expresión de los marcadores de pluripotencia, nos propusimos analizar los cambios ocurridos en los niveles de expresión de ciertos marcadores hepáticos: α -fetoproteína (marcador temprano), albúmina y α_1 -antitripsina (α_1 AT) (marcadores tardíos), durante la diferenciación temprana de las hAECs aisladas, ya sea inducida por factores o por medio condicionado. Esto nos permitirá evaluar la efectividad de los tratamientos empleados para la diferenciación y comparar los cambios celulares ocurridos en uno u otro caso. Así, evaluamos la expresión de α -fetoproteína, albúmina y α_1 AT, luego de 1, 3 y 6 días de cultivo en medio de cultivo IMDM 10% SFB, suplementado o no con EGF (10ng/ml); o en medio condicionado de HepG2 (MC). Observamos que las

hAECs durante estos primeros días de cultivo en IMDM, no presentaron niveles significativos de expresión de los marcadores hepáticos estudiados. Por otro lado, según se esperaba, resultó significativa la expresión de α -fetoproteína, α 1AT y albúmina, en las células hepáticas HepG2, empleadas como control de expresión de dichas proteínas. Si bien, se visualizaron algunas variaciones en los resultados entre uno u otro amnios, en general observamos que el tratamiento con medio condicionado de hepatocitos, produjo, en todos los casos, un incremento en la expresión de los marcadores hepáticos analizados. En particular, el medio condicionado correspondiente al día 4 de cultivo (confluencia de las células) de HepG2 resultó el más efectivo como estímulo de diferenciación, ya que indujo el mayor aumento en la expresión de las proteínas. Esta determinación nos será útil en un futuro, a fines de emplear dicho medio condicionado para inducir la diferenciación de las hAECs. El tratamiento con EGF, en los días analizados, no generó un incremento significativo en la expresión de α -fetoproteína, α 1AT y albúmina. Si bien estos resultados podrían indicar que el MC es un medio de diferenciación más potente que el EGF, debemos considerar que el proceso completo de diferenciación hepática con factores, implica también el empleo de dexametasona.

La regulación de la proliferación y el progreso del ciclo celular en células pluripotentes son procesos casi desconocidos en la actualidad. Como objetivo final de este periodo de trabajo, nos propusimos analizar en qué medida se encuentra afectada la proliferación de las hAECs durante su diferenciación, ya sea con factores específicos o con medio condicionado. Como marcador de aumento o disminución de la proliferación analizamos el cambio en la síntesis de ADN, por incorporación de timidina marcada radioactivamente con tritio, en presencia o ausencia del medio de diferenciación correspondiente. Como también mantuvimos, en todos los casos, un control sin diferenciar, en el que se midieron los mismos parámetros de proliferación, esto nos permitió analizar los cambios basales de las hAECs en cultivo. Observamos que las hAECs poseen una tendencia a incrementar su proliferación, la cual se vuelve significativa a las 72 h de cultivo, para luego disminuir nuevamente a las 96 h. Cuando se trata a las células con MC-HepG2, la proliferación de las células disminuye significativamente, comparada con sus respectivos controles en IMDM. Esto podría deberse a que las células estén arrojando su ciclo celular (por el agregado de MC) antes de comenzar a diferenciarse. En efecto, las células que poseen capacidad de división, como las células madre, salen del ciclo celular y entran en la fase G0 (punto de restricción), para comenzar luego el proceso de diferenciación a célula especializada.

La regulación del ciclo celular y la proliferación, la expresión de genes de pluripotencia y de genes epiteliales, en las hAECs tratadas con EGF, es aún desconocida. Al tratar a las hAECs durante 3 días con EGF hemos observado que dicho factor estimula la proliferación de las células, en comparación con sus respectivos controles crecidos en IMDM. El EGF cumple un rol importante en la proliferación celular, la migración y la locomoción. Induce la proliferación de diferentes tipos celulares, el crecimiento de queratinocitos de la piel, de células epiteliales de la retina; ha sido involucrado en la promoción de la proliferación en la cicatrización de heridas de la piel. Los efectos moduladores de EGF, luego de su unión a su receptor, han sido asociados con el retardo de la diferenciación y el aumento en la proliferación, a través de la regulación de genes reguladores del ciclo celular. En el caso de las hAECs, el tratamiento con EGF estimularía la proliferación celular, promoviendo asimismo la diferenciación hepática en combinación con la dexametasona.

CONCLUSIONES

En resumen del trabajo realizado durante el periodo transcurrido, podemos afirmar que logramos implementar de manera exitosa, un método para obtener células madre del amnios de la placenta humana. A través de este método, hemos sido capaces de aislar con eficiencia y con alto grado de pureza hAECs y hAMCs, con óptimos porcentajes de vitalidad y número de células. Hemos mantenido las hAECs en cultivo durante un período prolongado, sin contaminaciones, y logramos que las hAECs crezcan adheridas a las placas de cultivo. Todo ello nos permitió continuar avanzando en la caracterización y posterior diferenciación de las células madre a hepatocitos. Así, logramos determinar que las células aisladas del amnios, poseen características de células madre, pues expresan los marcadores típicos de pluripotencia y autorrenovación. Por otro lado, fuimos capaces de evaluar los cambios en dicha expresión a lo largo del tiempo, observando que a medida que transcurren días en cultivo, la expresión de Sox-2, Oct-4 y Nanog disminuye. Lo mismo ocurrió cuando se sometió a las hAECs al proceso de diferenciación hepática, ya sea inducido por medio condicionado de hepatocitos, o por factores externos agregados al medio de cultivo. Estos resultados nos indicarían el inicio de un proceso de diferenciación, donde la supresión de la expresión de los genes de pluripotencia permite la expresión de nuevos genes hepáticos específicos. Cuando evaluamos la expresión de algunos de estos genes (α -fetoproteína,

α 1AT y albúmina), determinamos que el medio condicionado de hepatocitos en cultivo es capaz de inducir la expresión de los mismos, en los primeros 6 días de tratamiento. El EGF solo, no causó un aumento en la expresión de estos marcadores. Sin embargo, el tratamiento con EGF en combinación con dexametasona, causó un cambio en la morfología de las hAECs, tornándola similar a la morfología de hepatocitos en cultivo. Asimismo, el EGF produjo un aumento en la proliferación de las hAECs durante 3 días en cultivo, lo cual no ocurrió con el tratamiento con el medio condicionado.

En conclusión, durante este año informado, hemos logrado avanzar en el conocimiento del proceso de diferenciación hepática de las hAECs. Identificamos como células madre a las células amnióticas y pudimos evaluar parcialmente las capacidades de diferenciación de factores específicos, así como de medios condicionados de hepatocitos en cultivo. Si bien aún resta una gran cantidad de experimentos que realizar, y mucho para evaluar, creemos que nos hallamos en el camino adecuado para lograr diferenciar las hAECs a hepatocitos y luego analizar *in vivo* la capacidad regenerativa de las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sipe JD (2002) Tissue engineering and reparative medicine. *Ann N Y Acad Sci* 961: 1-9.
2. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhring HJ, et al. (2008) Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 26: 300-311.
3. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, et al. (2007) Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod* 77: 577-588.
4. Matikainen T, Laine J (2005) Placenta--an alternative source of stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 544-549.
5. Murphy S (2011) Placental-Derived Stem Cells: Potential Clinical Applications. *Stem Cells & Regenerative Medicine*; 243-263.
6. Tamagawa T, Ishiwata I, Saito S (2004) Establishment and characterization of a pluripotent stem cell line derived from human amniotic membranes and initiation of germ layers in vitro. *Hum Cell* 17: 125-130.
7. Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N, Itakura T (2003) Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 980: 48-56.
8. Liu YH, Vaghjiani V, Tee JY, To K, Cui P, et al. (2012) Amniotic epithelial cells from

- the human placenta potentially suppress a mouse model of multiple sclerosis. *PLoS One* 7: e35758.
9. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, et al. (2003) Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 12: 545-552.
 10. Carbone A, Paracchini V, Castellani S, Di Gioia S, Seia M, et al. (2013) Human Amnion-Derived Cells: Prospects for the Treatment of Lung Diseases. *Curr Stem Cell Res Ther*.
 11. Wallace K, Burt AD, Wright MC (2008) Liver fibrosis. *Biochem J* 411: 1-18.
 12. Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Yagi H, Yarmush ML (2009) Stem cells for liver repopulation. *Curr Opin Organ Transplant* 14: 667-673.
 13. Forbes SJ (2008) Stem cell therapy for chronic liver disease--choosing the right tools for the job. *Gut* 57: 153-155.
 14. Fitzpatrick E, Mitry RR, Dhawan A (2009) Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med* 266: 339-357.
 15. Evangelista M, Soncini M, Parolini O (2008) Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology* 58: 33-42.
 16. Pratama G, Vaghjiani V, Tee JY, Liu YH, Chan J, et al. (2011) Changes in culture expanded human amniotic epithelial cells: implications for potential therapeutic applications. *PLoS One* 6: e26136.
 17. Bilic G, Zeisberger SM, Mallik AS, Zimmermann R, Zisch AH (2008) Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant* 17: 955-968.
 18. Bhora FY, Dunkin BJ, Batzri S, Aly HM, Bass BL, et al. (1995) Effect of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin. *J Surg Res* 59: 236-244.
 19. Blaimauer K, Watzinger E, Erovic BM, Martinek H, Jagersberger T, et al. (2006) Effects of epidermal growth factor and keratinocyte growth factor on the growth of oropharyngeal keratinocytes in coculture with autologous fibroblasts in a three-dimensional matrix. *Cells Tissues Organs* 182: 98-105.
 20. Sarret Y, Woodley DT, Grigsby K, Wynn K, O'Keefe EJ (1992) Human keratinocyte locomotion: the effect of selected cytokines. *J Invest Dermatol* 98: 12-16.
 21. Steindl-Kuscher K, Boulton ME, Haas P, Dossenbach-Glaninger A, Feichtinger H, et al. (2011) Epidermal growth factor: the driving force in initiation of RPE cell proliferation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 249: 1195-1200.
 22. Tong PS, Horowitz NN, Wheeler LA (1990) Trans retinoic acid enhances the growth response of epidermal keratinocytes to epidermal growth factor and transforming growth factor beta. *J Invest Dermatol* 94: 126-131.

ABSTRACT

The placenta and fetal membranes have recently been proposed as an important stem cells source for regenerative medicine. Gestational cells offer considerable advantages over other stem cells such as bone marrow or

embryo-derived cells. There is a virtually unlimited potential supply of, an easy access to such tissues, and minimal ethical and legal barriers are associated with their collection and use. Epithelial amniotic cells (hAECs) can be isolated from the amnion of the human placenta at term. They express embryonic stem cells markers and have the ability to differentiate toward all three germ layers. Moreover, their immunosuppressive properties might render allogenic application possible. These characteristics would make hAECs ideal candidates for tissue engineering and application in regenerative medicine. Hepatic failure is one of the major causes of morbidity and mortality worldwide. Although it is the best way to treat liver transplantation for acute and chronic hepatic failure patients, there are several obstacles. Recently, stem cells have been spotlighted as alternative sources of hepatocytes because their potential for hepatogenic differentiation.

The aim of our project is to study the human placenta as a novel and interest source of stem cells with regenerative properties for different tissues pathologies.

In particular, the objectives for the present work are:

- Isolation and characterization of the human amniotic epithelial cells
- Study of molecular mechanisms involved in hepatic hAECs differentiation: apoptosis, proliferation and activated signaling pathways

As a clinical application, we aim to develop an alternative strategy to liver transplantation, in patients with chronic hepatic disease.

In the present work we have successfully isolated and characterized the hAECs. We have determined that these cells possess stem cells properties and they are capable to initiate a hepatic differentiation process when they are properly treated. Our studies provide an improvement for the future application of hAECs in regenerative medicine

ANÁLISIS Y CORRELACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LOS GENES MARCADORES DE VIRULENCIA DOMINANTES *cagA*, *vacA* Y *babA* DE *HELICOBACTER PYLORI* EN MUESTRAS DE PACIENTES DISPÉPTICOS.

Medina, Myriam L

Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste.

RESUMEN

Introducción: Se ha postulado que algunos genes de *H. pylori* expresados diferencialmente entre cepas, pueden ser usados como marcadores de virulencia. **Objetivo:** Analizar y correlacionar biotecnológicamente los genes marcadores de virulencia dominantes *cagA*, *vacA* y *babA* de *Helicobacter pylori* en muestras de pacientes dispépticos. **Material y métodos:** Tipo de estudio: estudio observacional, descriptivo, transversal, con recolección prospectiva de datos. Se seleccionaron pacientes con sintomatología de dispepsia e indicación de videoendoscopia digestiva alta (VEDA), de ambos sexos que concurren al Servicio de Gastroenterología del Hospital Dr. Julio C. Perrando de Resistencia (Chaco) entre Septiembre 2011 a Septiembre 2012. Previo consentimiento informado, se completó una ficha epidemiológica y se tomaron muestras de placa dental, saliva y tejido gástrico mediante biopsias. Dentro de la anamnesis personal se hizo hincapié a los signos y síntomas dispépticos. El análisis histopatológico de las muestras de biopsias gástricas fue realizado en cortes histológicos. La detección de *H. pylori* en las muestras orales y gástricas se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) buscando amplificar el gen que codifica para la subunidad A de la ureasa (*ureA*). Para determinar el genotipo presente se buscó amplificar los genes correspondientes al antígeno inmunodominante, la citotoxina vacuolizante y/o a la adhesina de la bacteria (*cagA*, *vacA* y *babA2*, respectivamente). **Resultados:** Durante el período mencionado quedaron seleccionados un total de 61 pacientes con diagnóstico de dispepsia y con indicación de (VEDA); 30 eran de sexo femenino y 31, de sexo masculino (rango etario = 18 a 69 años, con una media de 45 años). Sobre 61 pacientes se detectó *H. pylori* mediante PCR en 31 muestras de biopsias gástricas y en 31 mues-

tras orales, lo que indica una prevalencia de infección del 50,8%, en ambas localizaciones. Si bien en las 31 muestras de biopsia gástrica positivas para *H. pylori* pudo realizarse la genotipificación, sobre las 31 muestras orales positivas para *H. pylori* sólo pudo ser estudiado el genotipo en 17 (16 placas dentales y 1 saliva) debido a mala calidad en el ADN extraído, muestra insuficiente o posibles falsos positivos. El genotipo *vacA* fue el más frecuente en todas las muestras, detectándose en el 100% de las muestras de cavidad oral (16 placas dentales y 1 en saliva) y en el 96,7% de las biopsias gástricas. Solo se halló diferencia significativa en el genotipo *cagA* siendo éste más frecuente en biopsia. La asociación genotípica más frecuentemente hallada en muestras orales fue *vacA/cagA* en 29,4% (5/17) seguido por la asociación *vaca/babA2* en el 17,6% (3/17).

En biopsias gástricas la asociación genotípica más frecuente fue *vacA/cagA* siendo de 61,2% (19/31), seguido de la asociación *cagA/vacA/babA2* con un 9,6% (3/31). En el 38,7 % (12/31) de las muestras del mismo paciente se halló concordancia entre genotipos presentes en muestras orales y en biopsias gástricas. Conclusión: La mayoría de los pacientes presentaron genotipos menos virulentos de *H. pylori*, tanto en cavidad oral como en tejido gástrico, siendo el genotipo *vacA*+ más frecuente tanto en cavidad oral como en biopsias gástricas, aunque no se puede afirmar que correspondan a las mismas cepas presentes en ambos sitios.

Palabras clave: genotipificación, correspondencia, *H.pylori*, dispepsia.

ABSTRACT

Introduction: It has been postulated that some genes differentially expressed between *H. pylori* strains , can be used as virulence markers . To analyze and correlate biotechnologically markers dominant virulence genes *cagA* , *vacA* and *babA* *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients samples . Methods: Type of study: observational, descriptive , transversal, with prospective data collection study. We selected patients with symptoms of dyspepsia and upper gastrointestinal indication videoendoscopia (VEDA) , of both sexes who attended the Gastroenterology Service of the Hospital Dr. Julio C. Perrando of Resistencia (Chaco) between September 2011 to September 2012. Prior informed consent, A questionnaire was completed and samples of dental plaque , saliva and gastric tissue biopsies were taken by . Within personal history he emphasized the dyspeptic signs and symptoms.

. Histopathological analysis of the gastric biopsy samples was performed on histological sections. The detection of *H. pylori* in the oral and gastric samples was performed by polymerase chain reaction (PCR) seeking amplify gene encoding the A subunit of urease (urea). To determine this genotype was sought to amplify the corresponding genes immunodominant antigen, the vacuolating cytotoxin and / or adhesin of the bacterium (*cagA*, *vacA* and *babA2* respectively). Results: During the period in question were selected a total of 61 patients diagnosed with dyspepsia and indicating (VEDA); 30 were female and 31 males (age range = 18 to 69 years, mean 45 years). About 61 patients *H. pylori* was detected by PCR in gastric biopsy samples 31 and 31 oral samples, indicating a prevalence of infection of 50.8%, in both locations. While in the 31 gastric biopsy samples positive for *H. pylori* genotyping was performed on 31 samples positive for *H. pylori* oral could only be studied genotype in 17 (16 dental plates and one saliva) due to poor quality DNA extracted, insufficient or potential false positive sample. *VacA* was the most prevalent genotype in all samples, was detected in 100% of the samples of the oral cavity (16 1 in dental plaque and saliva) and 96.7% of gastric biopsies. Only significant difference was found in *cagA* genotype was more frequent in this biopsy. Genotypic association most commonly found in oral samples were *vacA* / *cagA* in 29.4% (5/17) followed by the cow / *babA2* association in 17.6% (3/17).

In the most common gastric biopsies genotypic association was cow / *cagA* being 61.2% (19/31), followed by *cagA* / *vacA* / *babA2* association with 9.6% (3/31). In 38.7% (12/31) of the samples from the same patient concordance between genotypes present in oral and gastric biopsy samples was found. Conclusion: Most patients had less virulent genotypes of *H. pylori* in both oral cavity and gastric tissue, *vacA* + being the most common in both oral cavity and gastric biopsies genotype, although you can not say that apply to them strains present in both sites.

Key Word: genotificación , correspondence, *H. pylori* , dyspepsia

DETECCIÓN PRECOZ POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE GENOTIPOS CARCINOGENICOS GASTROENTERO HEPATICOS DE *HELICOBACTER PYLORI* Y *HELICOBACTER PULLORUM* EN POBLACIÓN INFANTIL

Marcelo G. Medina, Patricia Motta, María de los Ángeles López.
Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste,
Av. Las Heras 727, Resistencia, Chaco.

RESUMEN

La infección con *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) y *Helicobacter pullorum* (*H. pullorum*) están asociadas con el desarrollo de diferentes enfermedades gastroduodenales y hepáticas. Varios genes de virulencia de *H. pylori* se han relacionado con mayor riesgo de enfermedad gástrica. *H. pullorum*, actualmente se lo reconoce cada vez como un patógeno en seres humanos se lo ha aislado en las heces de pacientes con gastroenteritis, colangitis primaria esclerótica, cirrosis y carcinoma hepatocelular.

Objetivo: Detectar por biología molecular de genotipos carcinogénicos gastroentero hepáticos de *Helicobacter pylori* y *Helicobacter pullorum* en población infantil.

Métodos: *H. pylori* fue identificado en muestras de biopsias gástricas por Reacción en Cadena de la Polimerasa(RCP) de pacientes con dispepsia y criterios de endoscopia gástrica. El gen *vacA* y *cagA* fueron detectados por RCP multiplex. Mientras que *H. pullorum*, no fue hallado por RCP en las heces de estos pacientes.

Resultados: Por biología molecular *H. pylori* positivos fueron 21 (29,16%). Las cepas de *H. pylori* que fueron positivos para el gen *vacA* 66,66 % y para el gen *cagA* el 47,62% de las muestras. No se halló el gen *babA* , tampoco se detectó DNA de *H. pullorum*.

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. La base molecular de la colonización por *H. pullorum*

y virulencia es poco conocida y, por tanto, más estudios son necesarios para poder hallar y conocer más del potencial patógeno y su afectación a la salud pública.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, *Helicobacter pullorum*, genotipificación, pediátrico.

ABSTRACT

The Infection *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and *Helicobacter pullorum* (*H. pullorum*) are associated with the development of gastric and liver disease. Several virulence genes of *H. pylori* have been associated with increased risk of gastric disease. *H. pullorum*, now increasingly recognized as a pathogen in humans it has been isolated from the stools of patients with gastroenteritis, primary sclerosing cholangitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

Objective: To detect molecular biology of hepatic gastroenterologist carcinogenic genotypes of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter pullorum* in children.

Methods: *H. pylori* was identified in gastric biopsy samples by polymerase chain reaction (PCR) of patients with dyspepsia and gastric endoscopy criteria. The *vacA* and *cagA* gene were detected by PCR multiplex. While *H. pullorum*, it was not found by PCR in the feces of these patients.

Results: In molecular biology *H. pylori* positive were 21 (29.16%). *H. pylori* strains that were positive for 66.66% *vacA* and *cagA* gene for 47.62% of the samples. *Baba* gene was found, either DNA of *H. pullorum* was detected.

Conclusion: *H. pylori* strains isolated in our pediatric patients with gastroduodenal pathology, would have a significant pathogenic potential and should be included in the studies by molecular biology detection of *H. pylori* genotypes looking for more virulent strains. The absence of *babA2* gene may be suggestive of its importance as a specific marker for strains greater bonding capacity and greater pathogenic potential. The molecular basis of colonization by *H. pullorum* and virulence is not well known and, therefore, more studies are needed to find and learn more about the pathogenic potential and its impact on public health.

Key words: *Helicobacter pylori*, *Helicobacter pullorum*, genotypes, pediatrics.

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS Y EVALUACIÓN DE UNA ALTERNATIVA TERAPÉUTICA NATURAL PARA COMBATIR LA ENFERMEDAD.

Dr. Juan Ignacio Bastón, Lic. Luciana Ferella, Dra. Gabriela Meresman
Laboratorio de Fisiopatología Endometrial, Instituto de Biología y Medicina
Experimental (IBYME-CONICET)

SÍNTESIS DEL INFORME FINAL SUBSIDIO ROEMMERS 2012-2014

Los dolores intensos que sufren las mujeres con endometriosis, sumado a la incapacidad de concebir son los síntomas más urgentes que motivan a los investigadores a encontrar alternativas para mitigar esta enfermedad. Además, si bien no se considera a la endometriosis como una patología maligna, en los últimos años se la ha asociando con el aumento de la incidencia de contraer determinados tipos de cáncer epitelial de ovario lo cual pone de manifiesto la necesidad de abordar el estudio de su etiopatogenia.

La endometriosis tiene una prevalencia relativa elevada en la población femenina, y esto la convierte en la tercera patología ginecológica en importancia que afecta a las mujeres en edad reproductiva. A pesar de ello, los mecanismos fisiopatológicos involucrados en su etiopatogenia multifactorial aún no se conocen completamente. Sumado a esto, es relevante señalar la carencia de tratamientos que resulten absolutamente eficaces en contrarrestar la formación y el desarrollo de las lesiones endometriósicas. Además, los resultados de la terapéutica que se les propone actualmente a las pacientes que sufren de endometriosis son muy variables al momento de atenuar los síntomas clínicos característicos de esta enfermedad. Este conjunto de factores nos motivó a indagar e intentar lograr una comprensión más profunda de los eventos fisiopatológicos que intervienen en la complejión y en la consecuente sintomatología asociada a esta enfermedad.

Si bien hasta el momento no se conoce el rol potencial que galectina-1 (Gal-1) podría estar jugando en la fisiopatología de la endometriosis, cabe señalar que estudios recientes reportaron que esta lectina juega un papel importante en la patogénesis de otras enfermedades relevantes en el área de la medicina reproductiva, como por ejemplo, en los abortos espontáneos recurrentes y en la pre-eclampsia. Además, se ha demostrado desde hace

aproximadamente una década que Gal-1 desempeña un rol inmunomodulador y pro-angiogénico significativo en diversas variantes de cáncer, las cuales comparten mecanismos fisiopatológicos similares a los conocidos hasta el momento para la endometriosis.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, abordamos el estudio de uno de los principales eventos involucrados en la fisiopatología de la endometriosis: la angiogénesis. Este proceso da lugar al desarrollo vascular de las lesiones endometriósicas y su consecuente crecimiento en el sitio ectópico, y es por lo tanto un evento imprescindible en la progresión de la enfermedad. Por tal motivo, estudiamos *in vivo* el efecto de Gal-1 en la vascularización y en el crecimiento de las lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente en un modelo murino, y evaluamos en este mismo modelo si el bloqueo específico de esta lectina a nivel peritoneal restringe el crecimiento de estas lesiones, de manera tal que nos permita vislumbrar si la inhibición de los mecanismos fisiopatológicos mediados por Gal-1 puede tener a futuro un eventual valor terapéutico que permita abordar las causas etiopatogénicas y por consiguiente la sintomatología característica de esta patología.

Siendo así, recurrimos al modelo murino de endometriosis experimental optimizado en nuestro laboratorio y para el cual utilizamos ratones deficientes de Gal-1. Dicho modelo experimental nos permitió estudiar *in vivo* el rol funcional de Gal-1 en la fisiopatología de la endometriosis, particularmente sobre el crecimiento y la vascularización de las lesiones endometriósicas, como así también evaluar el efecto del bloqueo específico de esta lectina a nivel peritoneal.

Cabe aclarar que los modelos murinos de endometriosis experimental se encuentran ampliamente aceptados y han sido utilizados extensivamente para estudiar e intentar comprender las causas o consecuencias asociadas a los variados y complejos mecanismos fisiopatológicos implicados en la etiopatogenia de esta enfermedad humana, como así también, se han utilizado con el propósito de evaluar diversas estrategias terapéuticas que luego puedan trasladarse al tratamiento médico de las mujeres afectadas por esta enfermedad.

En los experimentos realizados con el modelo murino de endometriosis experimental hemos observado que la presencia de Gal-1 tanto en las lesiones endometriósicas como en el entorno peritoneal es de vital importancia para el crecimiento de las mismas, dado que la falta de expresión de Gal-1 en el tejido endometrial ectópico que conforma las lesiones, su ausencia en el contexto peritoneal, o bien en ambos a la vez, dio lugar a una marcada

reducción del tamaño de las mismas. Este resultado es de suma relevancia porque pone de manifiesto que esta lectina endógena ejerce un efecto fisiopatológico directo sobre las lesiones al promover su crecimiento.

Si bien no hallamos otros estudios que reporten el efecto de Gal-1 sobre el crecimiento de las lesiones endometriósicas, sí se han reportado trabajos concernientes a la fisiopatología de diversas formas de cáncer en los que se establece claramente que la expresión de esta lectina contribuye sustancialmente al crecimiento de los tumores inducidos experimentalmente en modelos murinos.

Aunque la deficiencia completa o parcial de la expresión de Gal-1 en nuestro modelo murino de endometriosis experimental demostró tener un efecto claro sobre el crecimiento de las lesiones, no se observaron diferencias aparentes en la estructura histológica de dichas lesiones dado que en los grupos experimentales analizados las lesiones están similarmente conformadas por glándulas secretoras rodeadas por un estroma celular compacto o laxo. Además, el patrón de expresión tisular de Gal-1 en las lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente en el modelo murino, refleja consistentemente el patrón de expresión tisular observado en las lesiones de las pacientes con endometriosis, ya que en ambos casos la expresión de esta lectina se encuentra confinada principalmente a las células estromales y en menor medida a las células endoteliales, pero no se detectó expresión de Gal-1 en las células epiteliales. Este mismo patrón de expresión tisular de Gal-1 se observó en el tejido endometrial eutópico que tapiza la cara interna de los cuernos uterinos murinos, tal como ya se había reportado en trabajos anteriores al nuestro, y es equivalente al que observamos en este trabajo en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis o controles. Esta semejanza entre las lesiones humanas y murinas en cuanto a su estructura histológica y a la localización tisular de Gal-1 nos permite en cierta medida convalidar el modelo de endometriosis experimental que utilizamos en este trabajo.

A continuación fue importante estudiar alguno de los múltiples mecanismos fisiopatológicos mediante los cuales Gal-1 pudiese estar promoviendo el crecimiento de las lesiones endometriósicas murinas. En base a literatura previa reportada principalmente en modelos de cáncer, decidimos evaluar si esta lectina se encuentra mediando efectos regulatorios pro-angiogénicos que promuevan el desarrollo de la red vascular requerida para sustentar el crecimiento activo de las lesiones.

De acuerdo a los resultados que se desprenden de este trabajo, la presencia de Gal-1 tanto en las lesiones endometriósicas y como en el entorno

peritoneal resultó ser de vital importancia para sustentar el desarrollo vascular de las lesiones, dado que en los grupos experimentales en los cuales no se expresa Gal-1 en las lesiones y/o en la cavidad peritoneal, el desarrollo de la red vascular fue significativamente menor. Además es importante resaltar que el efecto pro-angiogénico mediado por Gal-1 mostró ser independiente del efecto mediado por otros factores pro-angiogénicos como el VEGF y la citoquina murina CXCL2-KC, esta última es un análogo funcional a la citoquina pro-angiogénica humana IL-8, ya que la concentración de ambos factores en el líquido peritoneal murino fue similar entre los cuatro grupos experimentales estudiados.

Estos resultados muestran concordancia con estudios recientes en los cuales se ha demostrado fehacientemente que Gal-1 promueve activamente el proceso de angiogénesis tumoral y uno de los principales mecanismos inducidos por esta lectina en dicho proceso es la activación en forma independiente a la unión de su ligando canónico, de la vía de señalización intracelular mediada por el receptor tipo 2 de VEGF. Por lo tanto, si consideramos que en nuestro trabajo no se observaron cambios significativos entre los grupos analizados en relación a la expresión tisular de VEGF en las lesiones o en su concentración en el líquido peritoneal, como así tampoco en la expresión vascular de su receptor VEGFR2, y sin embargo el tamaño y la vascularización de las lesiones endometriósicas se redujo acentuadamente en los grupos que no expresan Gal-1 ya sea en las lesiones y/o en el entorno peritoneal, podríamos sugerir que la ausencia de esta lectina en dichos grupos podría ser en gran medida la responsable de ocasionar una inhibición de las vías angiogénicas mediadas por el VEGFR2, y consecuentemente del menor desarrollo vascular observado en las lesiones correspondientes a estos grupos experimentales en comparación con el grupo de ratones que expresan niveles fisiológicos de Gal-1.

Como ya se conoce, las terapias actuales para tratar a las pacientes con endometriosis incluyen la citorreducción de las lesiones por cirugía laparoscópica y/o el tratamiento farmacológico. Si bien ambas estrategias terapéuticas están dirigidas a mejorar los síntomas de la enfermedad, ninguna de ellas logra erradicar eficientemente las lesiones. Esto trae como consecuencia que la tasa de recurrencia en las pacientes intervenidas quirúrgicamente sea elevada, alcanzando hasta un 40-50% luego de los 5 años de culminado el tratamiento. Asimismo, los tratamientos farmacológicos prolongados que se les administran a las pacientes con endometriosis suelen ser poco efectivos y provocan efectos secundarios adversos, e incluso están contraindicados para las mujeres que desean lograr un embarazo.

Considerando esta problemática, sumado a los resultados concernientes al rol pro-angiogénico que Gal-1 ejerce sobre la vascularización y el consecuente crecimiento de las lesiones endometriósicas observados en nuestro modelo murino, ponen en relieve la importancia de estudiar si el bloqueo específico de los procesos fisiopatológicos mediados por esta lectina tiene potencial terapéutico. En ese sentido, decidimos evaluar en el modelo murino de endometriosis experimental, si la neutralización específica de Gal-1 a nivel peritoneal mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-Gal-1 (F8.G7) restringe el desarrollo de las lesiones endometriósicas y por lo tanto la progresión de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este trabajo son muy alentadores dado que el bloqueo de Gal-1 a nivel peritoneal con el anticuerpo neutralizante F8.G7 dio lugar a una gran disminución del tamaño de las lesiones endometriósicas, y si bien no alteró la estructura histológica de las mismas, sí redujo sustancialmente la vascularización de dichas lesiones de manera independiente al efecto pro-angiogénico potencial que puedan estar ejerciendo VEGF o CXCL2-KC. Este resultado pone de manifiesto que la neutralización de los mecanismos fisiopatológicos mediados por Gal-1 podría resultar de gran implicancia terapéutica para contener e incluso reducir el avance de la endometriosis.

Sin perder de vista que queda mucho camino por recorrer para esclarecer completamente el rol de Gal-1 en la fisiopatología de la endometriosis y comprobar si su bloqueo selectivo tendrá implicancias terapéuticas relevantes, consideramos estos resultados como un aporte importante al entendimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad.

Por otro lado, como ya dijimos, debido a la cuestionada eficiencia y a la alta tasa de recidivas observada luego de los tratamientos habituales, se están investigando alternativas terapéuticas que puedan administrarse por plazos prolongados y que a su vez no comprometan el bienestar de la paciente. En base a antecedentes satisfactorios reportados en la investigación del cáncer, se propuso evaluar *in vitro* la acción del flavonoide wogonina (WG) aislado de la raíz *Scutellaria baicalensis*, componente principal de la medicina herbal china, además de dos compuestos activos del extracto de romero: ácido carnósico (AC) y ácido rosmarínico (AR) y de la hormona $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D3 (VD3). Hemos observado que el agregado de WG, AC y AR a una línea celular estromal endometrial humana (T-HESC) por 24 hs inhibió significativamente la proliferación celular evaluada por el ensayo de MTS. Asimismo el estímulo con VD3 por 48 hs indujo una inhibición estadística-

mente significativa de la proliferación de T-HESC. Los ensayos con cultivos primarios de células endometriales provenientes de pacientes reprodujeron los resultados observados en la línea celular. Además, resultados preliminares advierten acerca de una inducción de la apoptosis por parte de AC, AR y WG en las células T-HESC. Considerando a la endometriosis como una enfermedad crónica que requiere del control de la proliferación endometrial para evitar las recidivas y a la luz de los resultados promisorios obtenidos, continuaremos estudiando estos compuestos naturales como potenciales estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta patología.

Consideramos que nuestros antecedentes son promisorios y advierten sobre la eficacia de estos compuestos naturales sobre el control del crecimiento endometriótico. Además, estos resultados constituyen el puntapié para estudiar las vías de regulación molecular, su acción sobre la apoptosis y el stress oxidativo en distintos tipos celulares endometriales y en el modelo *in vivo*.

STUDY OF MECHANISMS INVOLVED IN THE ESTABLISHMENT OF ENDOMETRIOSIS AND EVALUATION OF NATURAL COMPOUNDS AS NEW THERAPEUTIC AGENTS TO TREAT THE DISEASE

Endometriosis is a chronic disease, with high levels of recurrence after standard medical therapy. Galectin-1 (Gal-1) is an endogenous lectin that plays an essential role as immunomodulatory and proangiogenic factor in cancer. It has not been reported the involvement of Gal-1 in endometriosis pathophysiology. Thus, our main goal was to study the role of Gal-1 in growth and vascular development of endometriotic lesions. Endometriotic lesions were surgically induced by autologous transplantation of endometrial tissue to bowel mesentery of wild-type or Gal-1 knock-out mice for WT and KO groups respectively, by heterologous transplantation of endometrial tissue from Gal-1 knock-out to bowel mesentery of wild-type mice for hWT group, and the opposite for hKO group.

The past few years have seen a renewed interest in the use of natural compounds in the treatment of several diseases due to their advantages: long term administration with minimal side effects. Wogonin (WG), an active constituent of Chinese Herbal Medicine, is known to inhibit proliferation and induce apoptosis in many kinds of cancerous cells. Similarly, principal anti-oxidant components of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves, Carnosic

Acid (CA) and Rosmarinic Acid (RA), have been reported to have antioxidant and antitumor activities. Also, 1 α ,25-dihydroxivitaminD3 (VD3) demonstrated antiproliferative properties in several cancer models. So, the second objective of this work was to evaluate the effect of WG, CA, RA, and VD3 in vitro in experimental endometriosis. Stromal endometrial cells derived from endometriosis patients and the T-HESC cell line were cultured with WG, CA or RA for 24-h, or VD3 for 48-h.

We demonstrated that Gal-1 exerts a pivotal proangiogenic function in vascular network development of endometriotic lesions, being this process crucial for the lesions growth and pathology progression. The possibility to identify key mediator factors involved in endometriosis pathophysiology, allow us to suggest putative therapeutic approaches to successfully treat this disease.

In addition, all natural compounds evaluated exerted an inhibitory effect on endometrial cell proliferation. Our studies support the further investigation of novel, potentially safe and well-tolerated botanical products as future endometriosis treatments.

ESTUDIOS COMUNITARIOS EN PATOLOGÍAS TRANSMISIBLES Y NUTRICIÓN

Minvielle Marta C, Pezzani Betina C, Ciarmela María L, Rosa Diana, Isla Larrain Marina, Orden Alicia B, Martínez Cecilia P, Mariñelarena Alejandro, Apezteguía María del C.

Unidad Ejecutora: Facultad de Ciencias Médicas. Unidades Académicas participantes: Facultades de Cs. Exactas, Cs. Naturales y Museo y Cs. Veterinarias, UNLP.

RESUMEN

El Proyecto desarrollado con el subsidio de la Fundación Alberto J. Roemmers 2012-2014 se implementó en escolares vulnerables de los Municipios de La Plata y Berisso. Se realizó en tres etapas: 1- evaluación del estado nutricional y parasitario de los niños, 2- intervención terapéutica en los niños con alteraciones nutritivas y/o parasitados y 3- intervención educativa para evitar el retorno al estado de enfermedad. En la Etapa 1 se realizaron jornadas sanitarias en las cuales se realizaron encuestas para evaluar características socio-culturales y clínicas. Se realizó el estudio parasitológico de escolares y mascotas; se extrajo una muestra de sangre para evaluación de anemia, niveles de calcio y magnesio y determinación de anticuerpos antitoxocara y antitoxoplasma y se evaluaron indicadores antropométricos. En la Etapa 2, se realizó tratamiento individual y selectivo para las patologías detectadas. Para la Etapa 3, se realizaron junto a estudiantes universitarios, jornadas educativas de prevención y promoción de la salud en la comunidad, teniendo en cuenta las patologías detectadas. De 185 muestras fecales, 49,8% estaban parasitadas; de 121 muestras sanguíneas, 9,1% presentó anemia, 29% hipocalcemia, 19,9% hipomagnesemia, 29% eosinofilia, 8,3% anticuerpos antitoxocara y 1,7% antitoxoplasma. De 282 evaluaciones antropométricas, resultaron 3,9% con baja talla /edad, 0,7% con bajo peso/edad y 18,1% con sobrepeso/obesidad. Los resultados señalan la necesidad de realizar estudios poblacionales para evaluar la situación de escolares de diferentes comunidades y establecer la brecha significativa respecto de las estadísticas hospitalarias, que registran solamente los problemas agudos; y no detectan enfermedades crónicas de la infancia, como anemia, infecciones parasitarias intestinales y alteraciones nutricionales en poblaciones con acceso limitado a servicios de salud.

INTRODUCCIÓN

Muchos países en vía de desarrollo han experimentado un significativo descenso de la mortalidad infantil en las últimas tres décadas. Pero aún persisten problemas tales como la desnutrición, anemia e infecciones parasitarias que afectan el desarrollo físico e intelectual de los niños. Las deficiencias de micro nutrientes y las enfermedades parasitarias muestran interacciones complejas que se retroalimentan generando un detrimento de la salud, afectando principalmente a niños de países en desarrollo.

El Proyecto desarrollado con el subsidio de la Fundación Alberto J. Roemmers 2012-2014 se implementó en escolares vulnerables de los Municipios de La Plata y Berisso. Se realizó en tres etapas: 1- evaluación del estado nutricional y parasitario de los niños, 2- intervención terapéutica en los niños con alteraciones nutritivas y/o parasitados y 3- intervención educativa para evitar el retorno al estado de enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la Etapa 1 se realizaron jornadas sanitarias convocadas por los Directivos del Jardín y Escuela del paraje rural "La Hermosura"(Berisso); del Jardín y Escuela de Villa Castells y del Jardín y Escuela de Manuel B. Gonnet (La Plata), provincia de Buenos Aires. A estas jornadas asistieron los padres/tutores de los niños. Se realizó una encuesta voluntaria individual para evaluar características socio-culturales y clínicas de cada uno de los escolares. Se entregaron recipientes para el estudio parasitológico de las personas y de las mascotas. Se elaboró un informe que fue entregado en sobre cerrado a cada padre/tutor. Se extrajo una muestra de sangre (voluntaria, con consentimiento informado) para evaluación de anemia, niveles de calcio y magnesio y determinación de anticuerpos antitoxocara y antitoxoplasma. También se realizó el registro de peso y talla e índice de masa corporal para evaluar desnutrición/sobrepeso/obesidad según recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud. Se recolectaron muestras del agua de los establecimientos y de algunos hogares para determinar contaminación microbiana. Se desarrolló una base de datos y se analizaron las asociaciones entre las parasitosis encontradas, la contaminación ambiental y de animales, anemia, alteraciones de la nutrición y las características socioculturales de cada uno de los encuestados. Se seleccionaron las estrategias de intervención en base a esta información.

En la Etapa 2, se realizó tratamiento antiparasitario gratuito individual y selectivo a los escolares parasitados quienes concurrieron al Centro de Salud N° 35 de Berisso (niños rurales) y al Centro de Salud N° 28 de La Plata (niños urbanos). También fue gratuito el tratamiento para los casos de anemia.

Para la Etapa 3, se convocó a estudiantes universitarios para participar activamente en los encuentros de promoción de la salud. Los docentes capacitaron a los estudiantes sobre la problemática parasitaria y la manera de evitar la transmisión con cambios en hábitos posibles de realizar en la comunidad. Con el asesoramiento de una Licenciada en Nutrición se capacitó a los estudiantes sobre conductas que pueden modificarse en niños con trastornos de la alimentación. Se evaluaron los hábitos riesgosos (no saludables) y saludables detectados en la comunidad, se identificaron las fuentes y vías de transmisión de las parasitosis, los reservorios parasitarios y las barreras que pudieran contrarrestar la diseminación de estas infecciones. Se establecieron cuáles serían las modificaciones necesarias para generar un cambio de situación que constituyeron los mensajes fundamentales en cada jornada educativa con la comunidad.

Por último, se elevó un informe a las autoridades educativas y sanitarias de cada comunidad.

RESULTADOS

Jardín y Escuela Primaria rural “La Hermosura”.

- Condiciones socio-sanitarias: el análisis de las 56 encuestas realizadas demostró que el único servicio que tenían los hogares de los escolares es el eléctrico, ya que no contaban con agua corriente, cloacas, ni gas natural y la recolección de residuos se realizaba solamente una vez por semana, teniendo que llevar la misma a la ruta asfaltada más próxima a cada domicilio. Las viviendas (69,7% precarias), estaban ubicadas muy distantes entre sí y en general, habitadas por una sola familia. El agua de consumo procedía de pozos y vertían sus desechos en pozos ciegos individuales. El baño se encontraba fuera de la vivienda en 9% de los hogares y 17,9% no poseía descarga de agua. La actividad principal de los tutores era la horticultura y fruticultura (51,8%) seguida de trabajo en tambos de la zona (26,8%) y muchas familias también recibían ayuda

- social. Almorzaban en el comedor escolar 53,65% de los niños, quienes al regresar a sus hogares colaboraban con la actividad familiar.
- El estudio parasitológico se realizó en 56 escolares (3 - 12 años). Resultaron parasitados 25 %. Las prevalencias específicas se presentan en la Tabla 1. Respecto a los estudios parasitológicos en animales no se presentan resultados pues ningún tutor aceptó realizar la toma de muestra a sus mascotas.
 - Se extrajo muestra de sangre a 25 escolares. Los registros de anemia, hipocalcemia e hipomagnesemia se presentan en la Tabla 2. No se detectó eosinofilia y sólo un niño fue reactivo para anticuerpos antitoxocara. No se detectaron anticuerpos antitoxoplasma.
 - Los estudios antropométricos evaluaron 26 alumnos. Presentaron baja talla para la edad 7,7%, ninguno tuvo bajo peso y 15,4% presentaron sobrepeso/obesidad.
 - Respecto a la contaminación microbiana del agua, solamente se analizó el agua de las escuelas pues los tutores de los hogares no accedieron a la toma de muestra. El resultado fue: bacterias coliformes totales: < 3 NMP/100 ml y bacterias coliformes fecales: < 3 NMP/100 ml, siendo aptas para consumo.
 - Se realizaron tres talleres de promoción de la salud y prevención de transmisión de parasitosis, tenencia responsable de mascotas y cambios alimentarios factibles para la comunidad.

Jardín y Escuela Primaria de Villa Castells.

- Condiciones socio-sanitarias: el análisis de las 72 encuestas realizadas demostró que los servicios que disponían todos los hogares de los escolares son electricidad y recolección domiciliar de residuos. No contaba con agua corriente 36,2%, sin gas natural 66,7% y sin cloacas 65,3%. Algunas viviendas eran precarias (23,7%), con piso de tierra (1,4%), con el baño fuera de la vivienda (11,2%) y sin descarga de agua (36,2%) y estaban ubicadas muy cercanas entre sí. El 65,3% de los tutores recibían planes sociales, 13,9% eran trabajadores informales y el resto, registrados. 44,5% de los niños recibían un almuerzo en el comedor escolar y cuando regresaban a sus hogares permanecían poco tiempo en ellos, concurriendo a clubes del barrio o permaneciendo en las calles.

- Tomaron las muestras para el estudio parasitológicos 72 escolares entre 3 y 12 años. La prevalencia de parasitados fue 65,3%. En la Tabla 1 se presentan las prevalencias específicas. El análisis parasitológico de las mascotas se realizó en 11 perros y 2 gatos. Resultaron parasitados 7 perros, tres de los cuales presentaron huevos de *Toxocara canis* en las muestras. El resto registró *Ancylostoma* spp y *Trichuris* spp. Se facilitó antiparasitario para su tratamiento.
- Se extrajo muestra de sangre a 49 escolares entre 3 y 12 años. Los registros de anemia, hipocalcemia e hipomagnesemia se presentan en la Tabla 2. Se registró eosinofilia en 32,7%, anticuerpos antitoxocara 14,3% y solo un escolar fue reactivo para anticuerpos antitoxoplasma.
- Los estudios antropométricos evaluaron 72 alumnos. Presentaron baja talla para la edad 5,6%, ninguno tuvo bajo peso y 9,8% presentaron sobrepeso/obesidad.
- Respecto a la contaminación microbiana del agua, se tomaron muestras del Jardín, de un arroyo donde los escolares se bañan en periodo estival, de las zanjas del barrio y de tres hogares. Todas las muestras del arroyo y de las zanjas resultaron no aptas para uso recreacional y 2/4 muestras de agua escolar/domiciliaria no aptas para consumo.
- Se realizaron ocho talleres de promoción de la salud y prevención de transmisión de parasitosis, tenencia responsable de mascotas y cambios alimentarios factibles para la comunidad.

Jardín y Escuela Primaria de Gonnet.

- Condiciones socio-sanitarias: el análisis de las 57 encuestas realizadas demostró que los servicios que tenían todos los hogares de los escolares eran electricidad y recolección domiciliaria de residuos. 14,1% no disponía de agua corriente, 47,4% sin gas natural y 26,4% sin cloacas. Algunas viviendas eran precarias (8,8%) pero ninguna con piso de tierra, con el baño fuera de la vivienda (8,8%), sin descarga de agua (14,1%) y estaban ubicadas muy cercanas entre sí. El 42,1% de los tutores recibían planes sociales, 19,3% eran trabajadores informales y el resto, registrados. Los niños no reciben almuerzo escolar y cuando regresan a sus hogares permanecen poco tiempo en ellos, concurriendo a clubes del barrio o permaneciendo en las calles.
- Tomaron las muestras para el estudio parasitológicos 57 escolares entre

3 y 12 años. La prevalencia de parasitados fue 54,4%. En la Tabla 1 se presentan las prevalencias específicas. Los escolares parasitados fueron derivados a la Unidad Sanitaria de la zona para el tratamiento. El análisis parasitológico de las mascotas se realizó en 16 perros y 5 gatos. Resultaron parasitados 2 perros, uno de los cuales presentó huevos de *T. canis* en la muestra. El otro registró *Giardia* spp y *Blastocystis* spp. De los cinco gatos, dos estaban parasitados con *T. cati* y los restantes presentaron *Capillaria* spp y uncinarias. Se facilitó antiparasitario a los dueños para su tratamiento.

- Se extrajo muestra de sangre a 47 escolares entre 3 y 12 años. Los registros de anemia, hipocalcemia e hipomagnesemia se presentan en la Tabla 2. Se registró eosinofilia en 40,5% escolares, anticuerpos anti-toxocara 4,3% y solo un escolar fue reactivo para anticuerpos antitoxoplasma.
- Los estudios antropométricos evaluaron 184 alumnos. Presentaron baja talla para la edad 2,8%, bajo peso 1,1% y 22,3% sobrepeso/obesidad. Respecto a la contaminación microbiana del agua, se tomaron muestras del Jardín y de cuatro hogares cuyos tutores accedieron a su análisis. La muestra del Jardín resultó apta para consumo, mientras que tres de las muestras domiciliarias no lo fueron.
- Se realizaron ocho talleres de promoción de la salud y prevención de transmisión de parasitosis, tenencia responsable de mascotas y cambios alimentarios factibles para la comunidad.

DISCUSIÓN

En este proyecto se implementaron estudios poblacionales sobre parasitosis y estado nutricional en escolares de 3 a 12 años en una institución escolar rural de Berisso y dos urbanas de La Plata, provincia de Buenos Aires. Se presenta el análisis de los resultados particulares de cada comunidad y una síntesis comparativa.

Escolares rurales

La presencia de niños parasitados no se asoció con ninguna de las variables registradas. A pesar de las condiciones sanitarias deficientes, fue el grupo con menor prevalencia parasitaria. Esta situación indicaría que la baja densidad poblacional y el escaso contacto con otros niños fuera de la

escuela, acotan la transmisión parasitaria. El parásito detectado con mayor frecuencia fue *B. hominis*, en concordancia con otros estudios llevados a cabo por el grupo y otros autores en comunidades similares. Como los tutores no acordaron analizar muestras de las mascotas, no pudimos registrar parasitosis zoonóticas que puedan estar circulando en esta comunidad. Sólo un niño resultó serológicamente reactivo para toxocariasis, y ninguno para toxoplasmosis, revelando las bajas frecuencias de estas zoonosis en la población rural analizada. Situación que se corrobora también por la ausencia de eosinofilia en los escolares. Como ya mencionamos, los niños evaluados pertenecen a hogares cuyos padres /madres son empleados de quintas productoras de hortalizas y frutas y estos alimentos constituyen su principal dieta. Como consecuencia, la ingesta de alimentos ricos en hierro es insuficiente. La prevalencia de anemia en estos escolares no resultó asociada a ninguna variable registrada. Si bien en este estudio no se realizaron las pruebas confirmatorias para deficiencia de hierro que recomienda el Comité Nacional de Hematología; teniendo en cuenta la bibliografía nacional e internacional, podemos considerar que la causa mas frecuente de anemia en esta población es la deficiencia de hierro.

Respecto a la evaluación antropométrica, la prevalencia de los indicadores de déficit es baja y solo correspondió a la talla para la edad. Sin embargo el sobrepeso/obesidad se presentó en el 15% de los niños, reflejando el nuevo panorama en las alteraciones de la nutrición que se reporta en varios países del mundo; al que nuestro país no está ajeno.

Escolares urbanos Villa Castells

Fue el grupo con mayor prevalencia parasitaria. La situación “estar parasitado” se asoció con vivienda precaria y ausencia de cloacas indicando que las deficientes condiciones sanitarias sumadas a la alta densidad poblacional, aumentarían la transmisión parasitaria. También el parásito de mayor frecuencia fue *B. hominis*, reforzando lo expresado para el grupo escolar anterior. La contaminación de las muestras de agua alcanzó 66,7% de los hogares y el 100% de aguas recreacionales y de zanjas (no se realizó análisis estadístico por el bajo número de muestras). El análisis parasitario de las mascotas reveló elevada frecuencia de parásitos, todos con potencial zoonótico. La presencia de eosinofilia y de anticuerpos antitoxocara y antitoxoplasma refuerzan la circulación de parásitos zoonóticos en esta comunidad. El registro de anemia se ubicó por debajo de la media publicada por la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud. La anemia, como la hipocalcemia e

hipomagnesemia, se asocian como ya se manifestó, con deficiencias crónicas dietarias.

Respecto a la evaluación antropométrica, la prevalencia de los indicadores de déficit es baja y solo correspondió a la talla para la edad; como ocurrió en el grupo anterior. Y nuevamente vemos un avance en los registros de sobrepeso/obesidad cercano al 8,5% de los niños, reflejando el inicio de un problema significativo a nivel mundial.

Escolares urbanos de Gonnet

Fue el grupo con mejores condiciones sanitarias, pero casi el 55% presentó parasitosis intestinal, no asociándose a ninguna variable registrada., dato que reforzaría que la densidad poblacional constituye un factor de riesgo en la transmisión de estas infecciones. Nuevamente, *B.hominis* fue el parásito prevalente. Si bien el 50% de las muestras de agua de los hogares resultó no apta para consumo, no se realizó análisis estadístico por el bajo número de muestras. El análisis parasitario de las mascotas evidenció una tenencia responsable de los perros pero no de los gatos, ya que el 100% de ellos estaban parasitados, revelando el riesgo zoonótico para estos niños. La detección de elevada eosinofilia y reactividad para anticuerpos antitoxocara y antitoxoplasma, refuerzan la circulación de parásitos zoonóticos en esta comunidad. En estos niños, la eosinofilia resultó asociada a tenencia de gatos. Ningún niño registró anemia, por lo que se deduce que la ingesta de alimentos ricos en hierro es suficiente. Pero los niveles detectados de hipocalcemia e hipomagnesemia demuestran que sus dietas no son tan equilibradas y/o diversificadas como para asegurar la incorporación de estos minerales. El estudio antropométrico reveló que los niveles de déficit son bajos; pero fue el grupo que mayor sobrepeso/obesidad registró, alcanzando a más del 20% de los niños. Este problema asociado a la inadecuada calidad de la alimentación se presenta en escolares cuyos hogares presentaban mejores condiciones sanitarias y cuyos tutores tuvieron la mayor frecuencia de trabajos registrados; acompañando la tendencia mundial ya mencionada.

Análisis comparativo:

Según estimaciones de la OMS (2011), aproximadamente el 10% de la población argentina menores de 14 años requiere quimioterapia preventiva para helmintiasis transmitidas por el suelo. Sin embargo, este escenario probablemente coincide con la situación en las provincias del norte del país, donde las infecciones por geohelminthos son frecuentes. Nuestros resultados,

al igual que los de otros estudios en la región indican que las geohelmintiasis son menos frecuentes en relación con el número total de niños infectados, siendo prevalentes *B. hominis*, *E. vermicularis* y *G. intestinales*. Además, los resultados muestran una baja asociación entre la presencia de escolares parasitados y malas condiciones sanitarias, sustentando a la densidad poblacional y frecuente relación con otros niños como factores que favorecen la circulación parasitaria.

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud 2005, en nuestro país presentan anemia 16% de los niños de 6 meses a 5 años. La prevalencia de anemia entre los escolares rurales estudiados superó tanto este valor como los reportados para las provincias del NEA (22,4%), NOA (17,5%) y GBA (17,9%). Entre los "Lineamientos de prevención y tratamiento de la anemia en la población materno infantil" publicado por el Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires se presenta el siguiente orden de grupos vulnerables según su importancia: niños menores de 2 años, embarazadas, mujeres en edad fértil, adolescentes y niños mayores de 2 años. Nuestros resultados, si bien la muestra analizada es de bajo número, deben alertar a las autoridades sanitarias que los niños de 3 a 12 años integrantes de hogares cuya accesibilidad a alimentos ricos en hierro es inadecuada, también constituyen un grupo vulnerable. Tanto los escolares rurales como urbanos presentaron déficits de calcio y magnesio sérico relevantes. Estas deficiencias fueron de nivel leve, generalmente relacionadas con un proceso crónico de origen dietario. Los datos corroboran que el sobrepeso y la obesidad son problemas de salud cada vez más comunes en niños y adolescentes. Si bien las tasa más altas se observan en Estados Unidos y Europa, la tendencia del incremento se ha generalizado en diversos países de Latinoamérica, incluyendo Argentina. La mayoría de los estudios revelan que esta tendencia sería el resultado de cambios culturales y ambientales relacionados con la inactividad física y la alimentación inadecuada. El eventual factor que puede asociarse es la composición hipercalórica de la dieta escolar y/o familiar que reciben estos niños. Estas observaciones coinciden con otros estudios poblacionales de América Latina, donde la desnutrición está siendo reemplazada por la obesidad en todos los estratos sociales.

CONCLUSIONES

Los resultados señalan la necesidad de realizar estudios poblacionales para evaluar la situación de escolares de diferentes comunidades y esta-

blecer la brecha significativa respecto de las estadísticas hospitalarias, que registran solamente los problemas agudos; y no detectan enfermedades crónicas de la infancia, como anemia, infecciones parasitarias intestinales y alteraciones nutricionales en poblaciones con acceso limitado a servicios de salud. Además, la anemia en niños en edad escolar de comunidades que no tienen acceso a una alimentación rica en hierro es un problema desatendido en los países en desarrollo. Teniendo en cuenta el carácter local de los resultados, surge la necesidad de desarrollar un mayor número de estudios en poblaciones de características similares.

Tabla 1: Prevalencias específicas en niños parasitados de establecimientos escolares de La Hermosura (rural), Berisso y de Villa Castells y Manuel B. Gonnet (urbanas), La Plata.

Localidad	La Hermosura n=56 (%)	Villa Castells n= 72 (%)	M. B. Gonnet n= 57 (%)
Niños parasitados	14/56 (25,0)	47/72 (58,3)	31/57 (54,4)
<i>B. hominis</i>	8/14 (57,2)	35/47 (74,5)	20/31 (64,6)
<i>E. vermicularis</i>	4/14 (28,6)	20/47 (42,6)	17/31 (54,9)
<i>G. intestinales</i>	2/14 (14,3)	10/47 (21,3)	7/31 (22,6)

Tabla 2: Prevalencias de anemia, hipocalcemia e hipomagnesemia en niños parasitados de establecimientos escolares de La Hermosura, Berisso y de Villa Castells y Manuel B. Gonnet, La Plata.

Localidad	La Hermosura	Villa Castells	M. B. Gonnet
Niños examinados	25 (%)	49 (%)	47 (%)
Anemia	7/25 (28,0)	4/49 (8,2)	0/47 (0,0)
Hipocalcemia	12/25 (48,0)	9/49 (18,4)	14/47 (29,8)
Hipomagnesemia	10/25 (40,0)	4/49 (8,2)	10/47 (21,3)

REFERENCIAS

1. Best C, Neufingerl N, van Geel L, van den Briel T, Osendarp S. The nutritional status of school-aged children: why should we care? *Food Nutr Bull* 31:400-2417, 2010.
2. Bracciaforte R, Diaz P, Vottero V, Burstein H, Varengo, M, Orsilles. Enteroparasitos en niños y adolescentes de una comuna periurbana de la provincia de Córdoba. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 44: 353-8, 2010.
3. Christensen L, Sguassero Y, Cuesta C. Anemia y adherencia a la suplementación oral con hierro en una muestra de niños usuarios de la red de salud pública de Rosario, Santa Fe. *Arch Argent Pediatr* 111: 288-94, 2013.
4. Donato H, Cedola A, Rapetti M, Buys M, Gutierrez M, Parias Nucci R, Rossi N, Schvartzman G. Anemia ferropénica. Guía de diagnóstico y tratamiento. *Arch Argent Pediatr* 107: 353-61, 2009.
5. Duran P, Mangialavori G, Biglieri A, Kogan L, Abeya Gilardon E. Estudio descriptivo de la situación nutricional en niños de 6-72 meses de la República Argentina. Resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS). *Arch Argent Pediatr* 107: 397-404, 2009.
6. Encuesta Nacional de Salud. Argentina, 2005. <http://datos.dinami.gov.ar/produccion/nutricion/ennys.html>
7. Gamboa M, Kozubsky L, Costas M, Garraza M, Cardozo M, Susevich M, Magisterio P, Navone G. "Asociación entre geohelminths y condiciones socioambientales en diferentes poblaciones humanas de Argentina". *Revi Panam Salud Publica* 26: 1-8, 2009.
8. Gamboa M, Navone G, Orden A, Torres M, Castro L, Oyhenart E. "Socio-environmental conditions, intestinal parasitic infections and nutritional status in children from a suburban neighborhood of La Plata, Argentina". *Acta Tropica* 118: 184-89, 2011.
9. Ianicelli J, Varea A, Falivene M, Disalvo L, Apezteguía M, Gonzalez H. Prevalencia de anemia en lactantes menores de 6 meses asistidos en un centro de atención primaria de la ciudad de La Plata. *Arch Argent Pediatr* 110: 120-5 2012.
10. Jukes M. Better education through improved health and nutrition: implications for early childhood development programs in developing countries. In Schroten H, Wirth S, eds. *Pediatrics Infectious Diseases Revisited*. SpringerLink 145-76, 2007.
11. Milano A, Oscherov E, Palladito A, Bar A. Enteroparasitosis infantil en un área urbana del noreste argentino. *Medicina (Buenos Aires)* 67: 238-42 2007.
12. Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, 2012.
13. <http://www.ms.gba.gov.ar/sitios/seguropublico/files/2012/03/Lineamientos-anemia.pdf>.
14. Minvielle M, Pezzani B, Córdoba M, De Luca M, Apezteguía M, Basualdo J. Epidemiological survey of *Giardia lamblia* and *Blastocystis hominis* in an Argentinian rural community. *Korean J Parasitol* 42: 61-6, 2004.
15. Molina N, Pezzani B, Ciarmela M, Orden A, Rosa D, Apezteguía M, Basualdo J, Minvielle M. Intestinal parasites and genotypes of *Giardia intestinalis* in school children from Berisso, Argentina. *J Infect Dev Ctries* 27: 527-34, 2011.

16. OMS Anthro (versión 3.2.2, enero de 2011). <http://www.who.int/childgrowth/software/es/>
17. Orden A, Torres M, Luis M, Cesani M, Quintero A, Oyhenart E. Evaluación del estado nutricional en escolares de bajos recursos socioeconómicos en el contexto de la transición nutricional. *Arch Argent Pediatr* 103:205–211, 2005.
18. Organización Panamericana de la Salud. 2009. La anemia entre adolescentes y mujeres adultas jóvenes en América Latina y El Caribe: un motivo de preocupación. [http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/AdolescentAnemiaSpan%20\(2\).pdf](http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/AdolescentAnemiaSpan%20(2).pdf)
19. Pezzani B, Minvielle M., Ciarmela M, Apezteguía M, Basualdo J. Participación comunitaria en el control de las parasitosis intestinales en una localidad rural de Argentina. *Rev Panam Salud Publica* 26: 471-7, 2009.
20. Pezzani B, Ciarmela M, Apezteguía M, Molina N, Orden A, Rosa D. Minvielle M. Intestinal Parasitoses in Suburban and Rural Schoolchildren in Argentina. *Revista de Patología Tropical* 41: 63-73, 2012.
21. Programa Remediar. Argentina. <http://www.remediar.gov.ar/>.
22. Thurlow R, Winichagoon P, Pongcharoen T, Gowachirapant S, Boonpradern A, Manger M, Bailey K, Wasantwisut E, Gibson R. Risk of zinc, iodine and other micronutrient deficiencies among schoolchildren in North East Thailand. *Eur J Clin Nutr* 60:623–632, 2006.

ABSTRACT

The project developed with the grant from the Roemmers Foundation 2012-2014, was implemented in vulnerable schoolchildren from the municipalities of La Plata and Berisso. It was conducted in three stages: 1- assessment of nutritional and parasitic status of children, 2- therapeutic intervention in children with nutritional disorders and / or parasitized and 3- educational intervention to prevent the return to the disease state. In Stage 1 sanitary meeting in which surveys were conducted to assess socio-cultural and clinical characteristics were performed. Parasitological study was conducted on schoolchildren and pets; a blood sample was extracted for evaluation of anemia, calcium and magnesium and determining antitoxocara antitoxoplasma antibodies; and anthropometric indicators were evaluated. In Stage 2, individually and selective treatment for the detected pathologies was performed. For Step 3, were conducted with college students, educational meetings on prevention and health promotion in the community, taking into account the detected pathologies. Of 185 fecal samples, 49.8% were parasitized; of 121 blood samples, 9.1% had anemia, 29% hypocalcemia, 19.9% hypomagnesemia, 29% eosinophilia, 8.3% antitoxocara and 1.7% antitoxoplasma anti-

bodies. Of 282 anthropometric assessments, were 3.9% stunting, 0.7% with underweight and 18.1% overweight / obesity. The results indicate the need for population studies to assess the situation schoolchildren from different communities and establish the significant gap with hospital statistics; which record only the acute problems, and not detect chronic childhood diseases such as anemia, intestinal parasitic infections and nutritional disorders in populations with limited access to health services.

RESPUESTA INMUNE AL STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE EN PACIENTES CON DEFICIENCIA ESPECIFICA DE RESPUESTA A ANTÍGENOS POLISACÁRIDOS.

Constanza Otero

IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) comprenden un grupo heterogéneo de condiciones médicas que se caracterizan por presentar una falla en uno o más componentes del sistema inmune. La falla de respuesta específica a antígenos polisacáridos o SPAD, por sus siglas en inglés (Specific Polysaccharide Antibody Deficiency) es una patología del sistema inmune de etiología desconocida, y los pacientes que la presentan son incapaces de montar una respuesta de anticuerpos específica para antígenos polivalentes de origen polisacárido, aunque tienen niveles normales de inmunoglobulinas en suero. Estos pacientes normalmente se presentan con infecciones, siendo el *Streptococcus (S.) pneumoniae* la más frecuente.

Nuestra hipótesis de trabajo es que además de los defectos que se han reportado en los LB de los pacientes con SPAD, sería posible encontrar alteraciones en otros tipos celulares, fundamentales para el desarrollo de una respuesta adaptativa adecuada frente al neumococo.

Nuestros resultados muestran que la disminución del porcentaje de LT CD4+, CD8+, CD69+ y CD25+ con la edad que se observa en los sanos está ausente en los pacientes con SPAD. Al evaluar la activación *in vitro* de estas células frente a *S. pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis* inactivadas por calor (Spn y Mtb), también se observaron alteraciones en los pacientes SPAD.

En conclusión, hemos demostrado que en los pacientes con SPAD existen algunas diferencias en los LT con respecto a los individuos sanos y que pueden estar relacionados a los cambios madurativos del sistema inmune que ocurren con la edad. Consideramos que esta IDP es mucho más compleja de lo que se creía hasta el momento.

ABSTRACT

Specific polysaccharide antibody deficiency (SPAD) is a well reported immunodeficiency characterized by a failure to produce antibodies against polyvalent polysaccharide antigens, expressed by encapsulated microorganisms. The clinical presentation of these patients involves recurrent bacterial infections, being the most frequent agent *Streptococcus* (S.) *pneumoniae*. In SPAD patients few reports refer to cells other than B cells. Since the immune response to S. *pneumoniae* and other encapsulated bacteria was historically considered restricted to B cells, the antibody deficiency seemed enough to justify the repetitive infections in SPAD patients. Our purpose is to determine if there are defects in other leukocyte subpopulations that are important for the development of a proper adaptive immune response against S. *pneumoniae*. We here report that age related changes observed in healthy children involving decreased percentages of LT CD4+, CD8+, CD69+ y CD25+ T cells, are absent in SPAD patients. Alterations can also be observed in these cells, when challenged with heat killed inactivated S. *pneumoniae* (Spn) and *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), supporting the idea that the immune deficiency in SPAD patients is more complex than what has been described up to now.

PREDICTORES DE MAL PRONÓSTICO EN PACIENTES SÉPTICOS

Silvia Perés, Gabriela Camicia, Mabel Noguerras, Eleonora Cunto.
Hospital de Infecciosas Dr. F. J. Muñiz

RESUMEN

Introducción: Las Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) son un mecanismo de defensa contra patógenos. Si bien ha sido demostrado el rol beneficioso de los mismos en las infecciones, su acumulación podría causar injuria y daño endotelial. La ADNasa I humana es una enzima que jugaría un rol clave en la depuración de NETs, mutaciones en este gen podrían llevar a una acelerada degradación o persistencia de los mismos. Los **objetivos** de este trabajo fueron analizar la asociación entre 4 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen de la ADNasa I y la susceptibilidad al desarrollo de sepsis, agravamiento o muerte y desarrollar un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa de NETs en suero, a fin de correlacionar sus niveles con las diversas variables clínicas y genéticas estudiadas.

Metodología: Se estudiaron 232 sujetos argentinos: 111 con sepsis y 121 controles sanos. Se registraron variables clínicas y outcome (muerte o sobrevida). Se investigó la presencia de 4 SNPs por técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Q222R y R-21S) o análisis de secuenciación automática (Y95S y R105G). Además se reclutaron 28 pacientes con sepsis y 12 controles sanos para el desarrollo del ELISA.

Resultados: De los cuatro SNPs analizados, solamente la frecuencia genotípica AA del SNP Q222R mostró diferencias significativas entre ambos grupos -OD=3,376 [1,279-8,908], $p=0.014$. Por otra parte, no se encontró asociación entre los polimorfismos analizados y las variables clínicas estudiadas ($p>0.05$). Los niveles de equivalentes de NETs detectados por ELISA mostraron niveles significativamente más elevados en los pacientes con sepsis vs grupo normal: 1175 vs 0, $p=0.04$, respectivamente.

Discusión: Nuestros resultados indican que en población Argentina ser portador del genotipo AA para el polimorfismo Q222R en el gen de la ADNasa

I aumenta en más de tres veces las posibilidades del desarrollo de sepsis, sugiriendo que la DNasa I podría estar implicada en el desarrollo de esta patología. Los pacientes con sepsis cursan con niveles de NETs significativamente aumentados. Se abre así un camino para futuras investigaciones como también para el desarrollo de targets terapéuticos potenciales en sepsis.

Palabras clave: sepsis, DNasa I, trampas extracelulares de neutrófilos, ELISA.

ABSTRACT

Introduction: Neutrophil extracellular traps (NETs) are a novel defense mechanism against pathogens that involves the release of network structures of DNA, histones and antimicrobial agents by activated neutrophils. Despite the beneficial role of NETs during infections, it has been shown that their formation and accumulation might have a negative effect on the host, leading to tissue and endothelial damage. The human DNase I might play a key role in their clearance, therefore, mutations in its gene may lead either to the persistence or to an accelerated degradation of NETs. Our objectives were to analyze four non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the gene of human DNase I in septic patients and in a control group, to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative determination of NETs in serum and, finally, correlate their levels with clinical and genetic variables.

Methods: 232 Argentinean subjects were studied: 111 with sepsis and 121 healthy controls. Clinical variables and outcome of sepsis patients were recorded. The presence of the four SNPs in the DNase I gene in both groups was determined by PCR-RFLP (SNPs Q222R and R-21S) or automated sequence analysis (SNPs Y95S and R105G). Besides, 28 sepsis patients and 12 healthy controls were included for the development of ELISA.

Results: Among the analyzed SNPs, only the frequency of the AA genotype of Q222R showed significant differences between the septic and control groups -OR=3.376 [1.279-8.908]; $p=0.014$. No association between clinical variables and the 4 polymorphisms analyzed was found ($p>0.05$). The NETs equivalent levels detected by ELISA were significantly elevated in patients with sepsis ($n = 28$) compared with the control group ($n = 12$): 1175 vs 0 ($p=0.04$).

Discussion: Our results suggest that the carriage of the DNase I Q222R AA genotype would increase by three times the possibility of developing sep-

sis in the Argentina population, suggesting that the DNase I might be involved in the development of this pathology, as sepsis patients normally occur with significantly increased levels of NETs. This discovery could lead to future research on the pathophysiology of sepsis and also on the development of potential therapeutic targets in sepsis.

Key words: sepsis, DNase I, neutrophil extracellular traps, ELISA

BIBLIOGRAFÍA

1. New hope for sepsis, (2012) *Lancet* 379, 1462.
2. Camicia, G., Pozner, R., and de Larranaga, G. (2014) Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis, *Shock*.
3. Poli-de-Figueiredo, L. F. (2010) The ongoing challenge of sepsis in Latin America, *Shock* 34 Suppl 1, 1-3.
4. Vincent, J. L., Opal, S. M., Marshall, J. C., and Tracey, K. J. (2013) Sepsis definitions: time for change, *Lancet* 381, 774-775.
5. Carlet, J., Cohen, J., Calandra, T., Opal, S. M., and Masur, H. (2008) Sepsis: time to reconsider the concept, *Crit Care Med* 36, 964-966.
6. Riedemann, N. C., Guo, R. F., and Ward, P. A. (2003) The enigma of sepsis, *J Clin Invest* 112, 460-467.
7. Zygun, D. A., Laupland, K. B., Fick, G. H., Sandham, J. D., and Doig, C. J. (2005) Limited ability of SOFA and MOD scores to discriminate outcome: a prospective evaluation in 1,436 patients, *Can J Anaesth* 52, 302-308.
8. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science* 303, 1532-1535.
9. Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007) Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs, *Nat Rev Microbiol* 5, 577-582.
10. Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps, *J Cell Biol* 176, 231-241.
11. Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms, *Cell Microbiol* 8, 668-676.
12. Guimaraes-Costa, A. B., Nascimento, M. T., Froment, G. S., Soares, R. P., Morgado, F. N., Conceicao-Silva, F., and Saraiva, E. M. (2009) *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6748-6753.
13. Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., Yamamoto, N., and Akira, S. (2012) Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1, *Cell Host Microbe* 12, 109-116.

14. Baker, V. S., Imade, G. E., Molta, N. B., Tawde, P., Pam, S. D., Obadofin, M. O., Sagay, S. A., Egah, D. Z., Iya, D., Afolabi, B. B., Baker, M., Ford, K., Ford, R., Roux, K. H., and Keller, T. C., 3rd. (2008) Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age, *Malar J* 7, 41.
15. Steinberg, B. E., and Grinstein, S. (2007) Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death, *Sci STKE* 2007, pe11.
16. Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A., and Reichenbach, J. (2009) Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis, *Blood* 114, 2619-2622.
17. Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N., and Wang, Y. (2010) PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps, *J Exp Med* 207, 1853-1862.
18. Chang, A., Khemlani, A., Kang, H., and Proft, T. (2011) Functional analysis of *Streptococcus pyogenes* nuclease A (SpnA), a novel group A streptococcal virulence factor, *Mol Microbiol* 79, 1629-1642.
19. Camicia, G., and de Larranaga, G. (2013) [Neutrophil extracellular traps: a 2-faced host defense mechanism], *Med Clin (Barc)* 140, 70-75.
20. Meng, W., Paunel-Gorgulu, A., Flohe, S., Witte, I., Schadel-Hopfner, M., Windolf, J., and Logters, T. T. (2012) Deoxyribonuclease is a potential counter regulator of aberrant neutrophil extracellular traps formation after major trauma, *Mediators Inflamm* 2012, 149560.
21. Logters, T., Margraf, S., Altrichter, J., Cinatl, J., Mitzner, S., Windolf, J., and Scholz, M. (2009) The clinical value of neutrophil extracellular traps, *Med Microbiol Immunol* 198, 211-219.
22. Yasuda, T., Ueki, M., Takeshita, H., Fujihara, J., Kimura-Kataoka, K., Iida, R., Tsubota, E., Soejima, M., Koda, Y., Kato, H., and Panduro, A. (2010) A biochemical and genetic study on all non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the gene encoding human deoxyribonuclease I potentially relevant to autoimmunity, *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1216-1225.

OPTIMIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PCR PARA DETECCIÓN DE *PLASMODIUM* EN MOSQUITOS Y SANGRE HUMANA EN LA TRIPLE FRONTERA ARGENTINO-BRASILEIRO- PARAGUAYA.

Patricia G. Ramirez, Marina Stein, Griselda I. Oria y Raúl H. Lucero
Instituto de Medicina Regional – Universidad Nacional del Nordeste

RESUMEN

Entre los años 2012 y 2014 se trabajó en la optimización de una técnica de PCR para la obtención de *Plasmodium* a partir de mosquitos *Anopheles* y de sangre humana, y se evaluó la utilidad de un método para la detección directa de ADN *Plasmodium* por PCR en tiempo real a partir de muestras de pacientes que consistieron en manchas de sangre seca sobre papel de filtro recogidas en la Triple Frontera Argentino-Brasileiro-Paraguay. La detección e identificación de las especies de *Plasmodium* en los mosquitos utilizando la amplificación de PCR por semi-nested multiplex resultó negativa en los ejemplares estudiados. Se procesaron 639 muestras de sangre en papel de filtro, todas resultaron negativas para *Plasmodium*. Hasta el momento no se detectó infección reciente por *P. vivax* o *falciparum* o recidivas de infecciones pasadas por vivax en el grupo estudiado y en la región seleccionada para este trabajo lo que no impide continuar la vigilancia de laboratorio utilizando sobre todo métodos moleculares rápidos (PCR en tiempo real) sin descuidar la vigilancia entomológica en zonas de riesgo.

INTRODUCCIÓN

El paludismo o malaria es una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium*, siendo cuatro las especies que pueden parasitar al hombre: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*.

En el año 2013 se registraron en el mundo aproximadamente 198 millones de casos, que ocasionaron la muerte de alrededor de 584.000 personas (OMS 2014). En el continente americano, la transmisión de malaria ocurre

en 21 países y se estima que aproximadamente 203 millones de personas viven en áreas con algún riesgo de transmisión de esta enfermedad. Once de esos 21 países son de América del Sur: Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana Francesa, Guyana, Paraguay, Perú, Suriname y Venezuela. El parásito malárico que predomina en esta región es *Plasmodium vivax*, causante del 71% de los casi 960 mil casos en los países con transmisión, mientras que la mayoría de los casos restantes se deben a *Plasmodium falciparum* (OPS, 2002).

El ciclo de vida del parásito es complejo, necesitando dos hospedadores, un vertebrado y un mosquito hematófago. En el caso de la malaria humana el hospedador definitivo, donde se produce la reproducción sexual son mosquitos hembra del género *Anopheles* (Forattini, 2002).

Desde 2010 no se registran casos autóctonos en Argentina y a partir de 2012 nuestro país entró en la fase de pre-eliminación, en la cual se halla actualmente (OMS 2014). *Anopheles pseudopunctipennis* es vector del paludismo en la región para-andina y *An. darlingi* en la región misionera (Bejarano 1959). En la ciudad de Puerto Iguazú (provincia de Misiones) se han registrado 54 casos a principios de 2006, 65 en total en ese año, 309 en 2007 y 19 en 2008, aunque no hubo evidencias de que *An. darlingi* fuera el vector (datos del Ministerio de Salud, Vega, com. personal).

Tradicionalmente, el diagnóstico se efectúa por el exámen microscópico de sangre periférica teñido con tinciones hematológicas, como el Giemsa (OMS, 1992). Hoy día esta técnica sigue siendo el método de referencia. La sensibilidad de la gota gruesa es de hasta 10 a 30 parásitos por microlitro de sangre, lo que aproximadamente equivale al 0,001% de glóbulos rojos infectados. Sin embargo, esta técnica requiere de personal capacitado, particularmente cuando las parasitemias son bajas o existe una infección mixta.

Desde hace ya casi veinte años se cuenta con un creciente número de métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos (PCR) para el diagnóstico de malaria. El valor de este enfoque radica en su alta sensibilidad, puesto que puede detectar de tres a cuatro parásitos por μ l de sangre (0,0005% a 0,0015% de glóbulos rojos infectados). Además, permite la diferenciación certera de las especies del parásito, cuando existen dificultades para su diferenciación morfológica o una infección mixta. En consecuencia, el enfoque molecular tiene la potencialidad de suplir algunas limitaciones del método microscópico, especialmente en lo pertinente a sensibilidad y especificidad, si bien esta tecnología también tiene inconvenientes inherentes a la técnica y a los costos e infraestructura que requieren. (Lopez et al. 2011).

Uno de los grandes avances en el diagnóstico molecular es la detección basada en fluorescencia desde la integración del ADN en la PCR en tiempo real. Esto plantea un nuevo reto para dirigir PCR a partir de sangre como fluoróforos que se templan en la presencia de hemoglobina.

Durante este estudio se evaluó la utilidad de este método para la detección directa de ADN *Plasmodium* por PCR en tiempo real a partir de muestras de pacientes que consistieron en manchas de sangre seca sobre papel de filtro recogidas en terreno.

Diagnosticar a tiempo una malaria puede ser vital para el enfermo, ya que la aparición de complicaciones está muy relacionada con la demora de la instauración del tratamiento. Así mismo contar con métodos eficaces y rápidos de detección de los agentes patógenos agiliza el diagnóstico y permite realizar vigilancia epidemiológica de estas patologías re-emergentes alertando a tiempo a los sistemas sanitarios y autoridades para la toma de decisiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La provincia de Misiones se encuentra situada en el extremo nordeste de la República Argentina. Está comprendida entre los paralelos 25° 28' y 28° 10' O de Latitud Sur, y los meridianos 53° 38' y 56° 03' de Longitud Oeste. Se encuentra ubicada en medio de dos países vecinos, Brasil y Paraguay, esta característica le imprime un marcado dinamismo a la zona de frontera, y en ella se evidencian las fluidas relaciones, a nivel social, cultural y económico con los países limítrofes (IPEC 2012). El trabajo se llevó cabo en la ciudad de Puerto Iguazú (25°36' S; 54°30' O), sobre el río Paraná, en la ciudad de Puerto Libertad (25°55' S; 54°35' O) y en la zona de Urugua-í (25° 55' S; 54°35' O). La ciudad de Puerto Iguazú, próxima al Parque Nacional Iguazú, reviste gran importancia turística y es también donde se registraron los últimos casos de paludismo en la provincia de Misiones. Puerto Iguazú forma un conglomerado urbano tri-nacional con las ciudades de Foz do Iguaçu (Brasil) y Ciudad del Este (Paraguay), las cuales comparten la misma problemática sanitaria. Puerto Libertad es el segundo municipio más grande del departamento Iguazú. Dentro de su jurisdicción se construyó la represa Urugua-í, que afecta a una superficie de 9.180 hectáreas en su nivel máximo aunque por lo general, el lago inunda sólo unas 8.200 hectáreas.

Trabajo de campo

Captura e identificación de mosquitos Anopheles

Se trabajó con mosquitos adultos capturados con trampa de luz tipo CDC adicionada con hielo seco en Puerto Iguazú, provincia de Misiones, entre octubre de 2010 y febrero de 2011. Los mosquitos fueron conservados a menos 20°C hasta su determinación y procesamiento. La determinación a nivel específico se realizó bajo lupa, conformando pools de hasta 30 individuos por especie. La determinación se basó en claves dicotómicas (Darsie 1985, Consoli y Lourenço de Oliveira 1994), descripciones originales y consultas a especialistas.

Obtención de muestras de sangre en papel de filtro

Los investigadores involucrados en este proyecto participaron del muestreo hematológico realizado en varias localidades de la Provincia de Misiones (en las ciudades de Puerto Iguazú, Puerto Libertad y Comandante Andresito), donde se tomaron 639 muestras de sangre en papel de filtro para ser procesadas por la técnica de PCR en tiempo real para la detección genérica de *Plasmodium* y cuando fue posible, también para determinaciones de especies del parásito.

Trabajo de laboratorio

Extracción de ADN

De cada pool, la cabeza y el tórax de los mosquitos fueron homogeneizados en solución salina (NaCl 0,9%). Se adicionó Chelex 100 μ l al 5% o 10%. Los productos fueron incubados a 100°C durante 10 minutos y centrifugados a 13000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue mezclado con un volumen 1:1 con cloroformo alcohol isoamílico y centrifugado a 10.000 rpm durante 5 minutos, tres veces. El nuevo sobrenadante fue mezclado con un volumen 1:1 de 70% etanol y centrifugado a 13.500 rpm durante 20 minutos. El pellet se secó a 37°C, y fue suspendido en 100 μ l de agua libre de nucleasa y mantenido a 4°C hasta el procesamiento por PCR.

Al incrementar el número de muestras se probó también, realizar la extracción de ADN a partir del papel de filtro mediante **schok térmico, sometiendo los tubos con trozos de papel y solución fisiológica a 100°C (ebullición) y luego a – 4 °C durante 3 minutos.**

Amplificación de PCR por semi-nested multiplex

La detección e identificación de las especies de *Plasmodium* en los mosquitos se realizó con una secuencia de dos PCR basadas en Rubio et al. (1999a, 1999b, 2002) con modificaciones. La mix de PCR para la primer reacción consistió en: 1x buffer PCR; 1,5 ul mmol/l MgCl₂; 0,5ul mmol/l dNTPs; 0,5ul mol/l de cada primer: UNR (Universal reverse) y PLF (*Plasmodium* spp.); 0,075 U/ul de Taq DNA polimerasa y 10 ul de DNA molde para un volumen final de 20 ul. La mix para la segunda reacción consistió en: 1 x buffer PCR; 1,5 mmol/l MgCl₂; 0,5 mmol/l dNTPs; 0,08 umol/l del primer PLF; 0,04 umol/l de cada primer reverse: VIR (*P. vivax*) FAR (*P. falciparum*); MAR (*P. malariae*); 0,075 U/ul Taq DNA polimerasa y 2 ul del amplicón proveniente de la primera PCR, para un volumen final de 20 ul. Para ambas PCRs se agregó 15 ul de aceite mineral antes de la amplificación. Los tamaños de los productos de las PCR fueron estimados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y teñidos con bromuro de etidio. Se emplearon los siguientes controles: un control negativo (mosquito no infectado de criadero) y sangre infectada con *P. vivax* y *P. falciparum*, a partir de muestras obtenidas por el Departamento de Epidemiología de la Provincia de Salta (Dr. Zaidenberg, com. personal).

Detección de Plasmodium por QPCR- PCR en tiempo real

La detección e identificación de *Plasmodium* spp. en muestras de sangre humana en papel de filtro se realizó con la técnica de one-step quantitative RT-PCR empleando un equipo de PCR en tiempo real marca Eco-Illumina de cuatro canales del cual dispone el equipo investigador. Se ensayaron sondas descriptas y consensuadas en la literatura y ampliamente utilizadas en estos trabajos y también se experimentaron con RT-PCR o SYBR verde - PCR en tiempo real - hemi anidada, sin usar una sonda para la verificación de la secuencia y también con Sondas Taqman desarrolladas por este equipo de trabajo, utilizando software específico para estos fines con bases de datos de virus obtenidas de genbank.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La detección e identificación de las especies de *Plasmodium* en los mosquitos utilizando la amplificación de PCR por semi-nested multiplex resultó negativa en los ejemplares estudiados. Para futuros estudios, es recomendable hacer ajustes en las PCR multiplex utilizados y poner a punto nuevamente

los controles que se pudieran obtener a partir de mosquitos positivos. Así mismo es importante continuar actividades de colecta de mosquitos adultos en terreno especialmente en las zonas consideradas de riesgo para contar con un número considerable que permita armar pooles y someterlos a detección molecular de estos parásitos considerando las variables temporales y espaciales de las capturas, manteniendo así condiciones de vigilancia.

Se procesaron 639 muestras de sangre (273 de sexo masculino y 366 de sexo femenino) en papel de filtro, con edades comprendidas entre 3 y 97 años. Los muestreos se realizaron en Puerto Iguazú (N=222), Comandante Andresito (N=57), Wanda (N=14) y Puerto Libertad (N=346), durante los meses de marzo a junio de 2014. Se procesaron la totalidad de las muestras con la técnica real time PCR para detección de *Plasmodium*, utilizando como control positivo muestras de sangre en papel de filtro provistas por la Dra. Silvia Blair Trujillo y su equipo de investigación del Grupo Malaria de la Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia. Al terminarse dichos controles, el Ministerio de Salud de la Nación a través del Dr. Mario Zaidenberg gestionó, con la Dra. Mejía Rosa Elena Consultor OPS/OMS, la obtención de muestras positivas de sangre en papel de filtro para *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, que fueron provistas por la Dra. Jessica Matamoros del Laboratorio Nacional de Malaria, Secretaría de Salud de Honduras. Se seleccionaron 86 muestras al azar de las ya procesadas utilizando los controles provistos por Honduras. Todas las muestras resultaron negativas para *Plasmodium*.

El uso de la PCR es recomendado como método de tamizaje en estudios epidemiológicos para la evaluación de los Programas de Control Nacional de Malaria, en estudios orientados a detectar de manera temprana parasitemias en pacientes tratados cuya posible causa pueda ser la resistencia a los antimaláricos y como prueba de referencia para evaluar nuevos métodos diagnósticos. Habida cuenta de que el equipo de trabajo y sus investigadores colaboradores cuentan con equipos para aplicar esta técnica y están entrenados en las mismas.

Hasta el momento no se detectó infección reciente por *P. vivax* o *falciparum* o recidivas de infecciones pasadas por *vivax* en el grupo estudiado y en la región seleccionada para este trabajo lo que no impide continuar la vigilancia de laboratorio utilizando sobre todo métodos moleculares rápidos (PCR en tiempo real) sin descuidar la vigilancia entomológica en zonas de riesgo.

Agradecimiento: a la Fundación Alberto J. Roemmers por el aporte del subsidio con el que se pudo realizar este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bejarano, J.F.R. 1959. *Anopheles* de la República Argentina y sus relaciones con el Paludismo. Primeras Jornadas Entomoepidemiológicas Argentinas, Primera Parte. 305-329.
2. Consoli, R.A.G.B. y R. Lourenço de Oliveira. 1994. Principais mosquitos de importancia sanitaria no Brasil. Fiocruz. Río de Janeiro. Brasil. 228 pp.
3. Darsie, R.F. 1985. Mosquitoes of Argentina. Part I. Keys for identification of adult females and fourth stages larvae in english and spanish (Diptera: Culicidae). Mosq. Sys. 17 (3): 153-253.
4. Forattini, O.P. 2002. Culicidologia Médica. 2o Volume: Identificação, Biologia, Epidemiologia. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 860 pp.
5. López, A; J. Coello; R. Mejía; Banegas E, Fontecha G. (2011). Comparación de gota gruesa y PCR para la detección de infecciones maláricas en Honduras. Revista Ciencia y Tecnología. 9: 68-81
6. Organización Mundial de la Salud. 1992. Métodos básicos de laboratorio en parasitología médica. 116 pp.
7. Organización Mundial de la Salud. 2014. World Malaria Report 2013. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Ginebra, Suiza.
8. Organización Panamericana de la Salud. 2002. Informe de la situación de los programas de malaria en las Américas (Basado en datos de 2001). Washington, D.C. USA.
9. Rubio, J.; A. Benito; P. Berzosa; J. Roche; S. Puente y M. Subirats. 1999a. Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. J Clin Microbiol 37:3260-3264.
10. Rubio, J.; A. Benito; J. Roche; P. Berzosa; M. Garcia; M. Mico; M. Edu y J. Alvar. 1999b. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60: 183-187.
11. Rubio, J.M.; R.J. Post; W.M. Docters van Leeuwen; M. C. Henry; G. Lindergard y M. Hommel. 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.

ABSTRACT

Between 2012 and 2014 a work based on optimizing a PCR technique for obtaining *Plasmodium* from *Anopheles* mosquitoes and human blood was performed, and the utility of a method for the direct detection of *Plasmodium* DNA was evaluated, using real time PCR in samples from patients which consisted of dried blood spots on filter paper collected in the tri-national Argentine-Brazilian-Paraguayan urban conglomerate. The detection and identifica-

tion of the species of *Plasmodium* in mosquitoes using PCR amplification by semi-nested multiplex was negative in the studied specimens. 639 blood samples in filter paper were processed, all were negative for *Plasmodium*. To date, no recent infection was detected by *P. vivax* or *P. falciparum*, or recurrence of past infections by *P. vivax* in the study group in the region selected for this work, which does not prevent continued laboratory vigilance especially using rapid molecular methods (real time PCR) without neglecting the entomological surveillance in risk areas.

DIVERSIDAD GENÉTICA Y ANÁLISIS DE MUTANTES DEL VIRUS DE HEPATITIS B EN LA PROVINCIA DE CÓRDOBA.

Viviana Ré , Fernando Gallego, María Belén Pisano, Carolina Torres, Luciana Caeiro, Maribel Martínez Wassaf, Marcos Balangero, Rodolfo Campos.

Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella" Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

RESUMEN

Mediante el análisis de los genomas del virus de la Hepatitis B (HBV) es posible identificar variantes virales denominadas genotipos, en los cuales se pueden distinguir diferentes comportamientos biológicos y clínicos. El objetivo de este estudio fue describir la actual epidemiología molecular y la diversidad genética de HBV en Córdoba, Argentina. Un total de 52 muestras pertenecientes a 40 individuos HBV mono-infectados y 12 individuos co-infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)-HBV fueron secuenciadas en el gene S y en la región del promotor basal core-precure (BCP-pC). Entre los pacientes mono-infectados se observó la presencia de subgenotipos F1b (35%) y F4 (17,5%), subgenotipos A2 (37,5%), C (5,0%) (el subgeno-tipo no pudo ser definido) y D (5,0%) (subgenotipo D2, y el otro no pudo ser definido). En individuos co-infectados la distribución de genotipos fue diferente: el sub-genotipo A2 fue el más comúnmente hallado (75,0%), seguido por el subgenotipo F1b (25,0%). Estos resultados muestran dos escenarios epidemiológicos: la población mono-infectada puede representar la composición étnica de la actual población humana de Córdoba, donde los orígenes amerindios (genotipo F) y europeo (subgenotipo A2) suman el 90% de las muestras; para los pacientes coinfectados, la alta prevalencia de subgenotipo A2 se asemeja a análisis previos realizados en Buenos Aires.

El objetivo de este estudio fue describir la actual epidemiología molecular y la diversidad genética de HBV en Córdoba, Argentina.

Realizamos un estudio retrospectivo (Enero 2009 a Diciembre de 2011) de 48 individuos adultos, [33 masculinos y 15 femeninos, media de edad 42 años ($r= 22 - 86$ a)] infectados con, habitantes de la ciudad de Córdoba, y otras ciudades pequeñas de la provincia. Diez muestras pertenecían a pacientes coinfectados con HIV.

Veinticuatro sujetos fueron infectados agudos, determinados por la presencia de anti-HBc IgM (+) (IMMULITE 2000 System, SIEMENS, Los Angeles, USA) y otros 24 fueron crónicos. En 23 muestras AgHBe fue detectado (ELISA HBeAg/Ab kit, KHB4IW RADIM, Roma, Italia). El proyecto de investigación fue inscripto y aprobado por el Comité de Ética del Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba (RepisNro002).

El DNA viral fue extraído a partir de muestras de suero usando QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Se amplificó Mediante nested-PCR dos fragmentos de la región genómica S y la región basal core- promotor precore (BCP-pC) (Pezzano et al., 2011).

EPIDEMIOLOGIA DE LA LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA EN UN ÁREA ENDÉMICA DE TRANSMISIÓN EN LA PROVINCIA DEL CHACO, ARGENTINA.

Juan Rosa¹, Enrique A Szelag^{1,2,4}, Matías A Parras^{1,2,4}, María G Quintana^{2,3,4}, Oscar D Salomón^{2,4}

¹Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste. Nodo REDILA (Red de Estudios de Investigación de la Leishmaniasis en Argentina), Chaco.

²Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT), Misiones. ³Instituto Superior de Entomología, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán (INSUE-UNT/REDILA). ⁴CONICET

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica parasitaria causada por un protozoario 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 distribuida en países de climas tropicales y subtropicales se enmarca entre las enfermedades emergente re-emergente.

En América se extienden desde México hasta el norte de 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 Argentina no está identificado, sin embargo, en la LV, el perro familiar (*Canis familiaris*) demostró ser el reservorio involucrado durante los ciclos de transmisión, similar a los ciclos endémicos/epidémico urbanos en América.

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 (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 sur.

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, 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. En la provincia del Chaco, el mapa de distribución actual está conformado por ocho especies de Phlebotominae potenciales vectores de LT.

La notificación de casos humanos de 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 endémico. 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 brotes.

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.

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

Area de estudio y sitio de muestreo: Las actividades se iniciaron en el municipio Pampa del Indio (26°02'54"S 59°56'32"O), Departamento Libertador General San Martín, Provincia del Chaco a partir de la coordinación previa con las autoridades sanitarias locales (Dirección Hospital regional de Pampa del Indio). Se realizó la confección de listas de parajes rurales y puestos sanitarios correspondientes, como así de los responsables de cada uno de ellos, en el caso de que hubiere. A partir del mes de noviembre de 2012 se iniciaron los contactos con el Agente Sanitario de uno de los parajes rurales de la región norte (Paraje Fortín Almirante Brown) distante a 27km del ejido urbano, próximo al Río Bermejo.

Búsqueda activa de casos humanos de Leishmaniasis Cutánea (LC): En el área rural del municipio, en compañía de la jefa del Laboratorio del Hospital de Pampa del Indio, se realizó la primera visita al puesto sanitario antes mencionado debido al antecedente de presentar casos humanos de LC, según fuente de datos secundarias (historias clínicas hospitalaria local). Se realizó un sorteo aleatorio sistematizado por estratos y randomizados tomando el 20% como muestra representativa del total de viviendas habitadas. Se realizó un interrogatorio individual orientado a la identificación de personas con lesiones dérmicas y/o mucosas quienes serían derivados al sistema de salud local (hospital rural) a fin de continuar con el flujograma de diagnóstico de leishmaniasis según el Programa Nacional de Leishmaniasis y Ministerio de Salud provincial.

Captura de Phlebotominae: Se instalarán trampas de luz tipo CDC a 1,5m de altura desde el suelo con permanencia de 12 horas activas en horario crepuscular y nocturno con una frecuencia mensual de tres noches consecutivas. Los ejemplares serán conservados en alcohol 70% y diafanizados hasta su identificación según las propuestas de Galati, 2003.

RESULTADOS Y COMENTARIOS

Captura de Phlebotominae: De mayo de 2013 a diciembre de 2014 se capturaron en total 25.299 Phlebotominae distribuidos en orden de abundancia: *Mg. migonei* 53,31% (n=13487), *Ny. neivai* 43,34% (n=10964), *Ev. complejo cortelezzii* (incluye hembras de *Ev. cortelezzii* y *Ev. sallesi* de morfología similar) 1,65% (n=418), *Ev. cortelezzii* (macho) 0,85% (n=215), *Ev. sallesi*

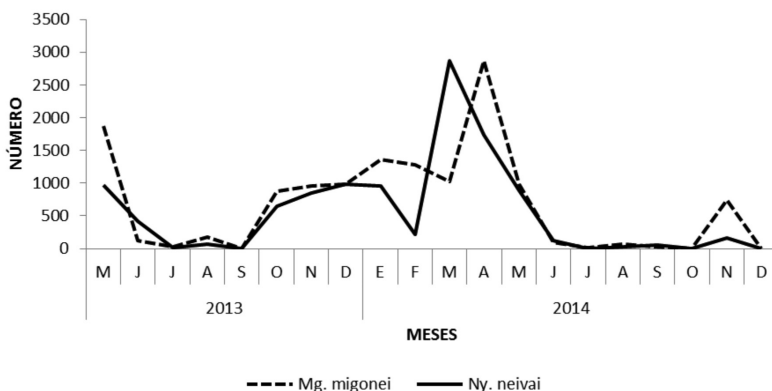
(macho) 0,4% (n=101), *Ev. aldafalcaoae* 0,007% (n=2) y *Psathyromyia shannoni* 0,003% (n=1). *Brumptomyia brumpti* 0,44% (n=111), carece de importancia epidemiológica por no transmitir la leishmaniasis. Los flebotominos fueron registrados en todos los meses del año destacándose con mayor abundancia en abril de 2014 (n=4846) con predominio de *Mg. migonei* (n=2873) seguido de *Ny. neivai* (n=1734). El menor registro fue en julio de 2014 (n=10) registrándose *Mg. migonei* (n=9) y *Ny. neivai* (n=1). En los meses de septiembre de 2013, octubre y diciembre de 2014 no se capturaron ejemplares de flebotomos. Los ejemplares del complejo *Evandromyia* (*Ev. sallesi* y *Ev. cortelezzi*) fueron las especies con registros de baja abundancia en tercer lugar. *Evandromyia aldafalcaoae* en escasa cantidad, fue registrado por primera vez en la región de transición en la provincia del Chaco (**Tabla II**).

Tabla II: Distribución mensual de Phlebotominae en Pampa de Indio, Chaco. Mayo 2013 a diciembre de 2014.

Especie / Meses	2013								2014												TOTAL
	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
<i>Mg. migonei</i>	1876	125	34	178	0	873	954	982	1362	1276	1027	2873	982	93	9	74	23	0	746	0	13.487
<i>Ev. cortelezzi</i>	11	8	0	6	0	24	23	9	12	22	14	66	5	6	0	0	0	0	9	0	215
<i>Ev. sallesi</i>	9	4	0	9	0	11	0	6	9	9	14	21	5	0	0	0	0	0	4	0	101
<i>Ev. cortelezzi/sallesi</i>	36	19	0	22	0	27	21	27	32	14	36	129	22	4	0	3	10	0	16	0	418
<i>Ny. neivai</i>	968	423	12	69	0	645	846	986	952	218	2866	1734	894	116	1	21	51	0	162	0	10.964
<i>Ev. aldafalcaoae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Brumptomyia</i> sp	19	3	0	0	0	4	3	11	7	2	26	23	5	0	0	0	0	0	8	0	111
<i>Pa. shannoni</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
TOTAL	2919	582	46	284	0	1584	1847	2021	2374	1541	3986	4846	1913	219	10	98	84	0	945	0	25.299

Migonemyia migonei y *Ny. neivai* fueron registradas en todos los meses del período estudiado. *Migonemyia migonei* destacó un primer pico de abundancia en mayo de 2013 (n=1876); en 2014 fueron en enero (n=1362) y abril (n=2873). *Nyssomyia neivai* presentó un comportamiento similar a *My. migonei* con mayor abundancia en mayo de 2013 (n=968), diciembre (n=986) y marzo (n=2866) de 2014. Los menores registros fueron en junio y julio de 2013 y en los mismos meses hasta octubre de 2014 (**Fig.2**).

Figura 2: Distribución mensual de *Migonemyia migonei* y *Nyssomyia neivai* en Pampa del Indio, Chaco.



La distribución de flebotomos durante el período de estudio los destacaron en mayor abundancia en el peridomicilio de PI-S1 con predominio de *Mg. migonei* (n=6316). El extradomicilio se caracterizó por dominio de *Ny. neivai* en base (n=2279) seguido de *Mg. migonei* (n=1603) en PI-S1 y PI-S2, respectivamente. En el estrato de altura se capturaron todas las especies excepto *Ev. aldafalcaoae* y *Pa. shannoni* registradas en el domicilio y peridomicilio de ambos sitios de estudio (TABLA III)

Tabla III. Distribución de Phlebotominae según ecotopos en casa sitio de estudio. Pampa del Indio, Chaco.

	Domicilio		Peridomicilio		Base		Altura		
Especie	PI-S1	PI-S2	PI-S1	PI-S2	PI-S1	PI-S2	PI-S1	PI-S2	TOTAL
<i>Ev. cortelezzi/sallesii</i>	9	38	84	89	72	59	38	29	418
<i>Ev. cortelezzi</i>	5	0	52	36	60	23	24	15	215
<i>Ev. sallesi</i>	2	0	9	22	11	17	25	15	101
<i>Mg. migonei</i>	244	63	6316	2763	1564	1603	502	432	13.487
<i>Br. brumpti</i>	0	0	8	12	32	25	20	14	111
<i>Ny. neivai</i>	238	20	4902	1726	2279	1305	236	258	10.964
<i>Ev. aldafalcaoae</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	2
<i>Pa. shannoni</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1
TOTAL	498	122	11372	4649	4018	3032	845	763	25.299

Las áreas de estudio fueron seleccionadas por haberse registrado antecedentes de casos humanos con Leishmaniasis Tegumentaria (LT), históricos en la localidad de Tres Isletas y actuales, en Pampa del Indio. Ambos sitios se hallan en la franja transicional de las regiones fitogeográfica de Chaco Seco y Chaco Húmedo. La búsqueda activa de casos es una de las herramientas a implementar en la identificación de la situación epidemiológica real en un lugar y tiempo determinado. La confirmación etiológica de LT por *Leishmania braziliensis* realizada en el IMR-UNNE del caso clínico en el área rural generó la consulta espontánea de otros pacientes de otros parajes y del área urbana municipal identificándose la misma especie.

La captura de flebótomos en las áreas de estudio demostraron la presencia de *My. migonei* y *Ny. neivai* distribuidas por mes, estación anual y ecotopo muy variados, los que están etapa de análisis. Estas especies ya fueron identificadas en la provincia de Chaco caracterizándolas según región geográfica con predominio de *Ny. neivai* para la región de Chaco Húmedo y *My. migonei* para Chaco Seco. (Salomón et. al. 2008, Rosa et al. 2010, 2012)

Los resultados obtenidos en ambas áreas de estudio permiten observar que la diversidad de las especies se mantienen desde los primeros resultados parciales, en cambio, en el presente informe se destaca el incremento en la abundancia de todas las especies con predominio de *My. migonei* y *Ny. neivai*. Este incremento se justificaría, por un lado, porque las capturas se desarrollaron durante tres noches consecutivas y no una, como al iniciarse las actividades, al menos en la localidad de Tres Isletas. Por otro lado, los factores abióticos como temperatura y humedad relativa y precipitaciones pluviales podrían proponer nuevas hipótesis, en un contexto ecológico, para explicar los mayores picos de abundancia repetidos hasta dos veces por año de estudio. Además de los mencionados, las condiciones de paisaje y ambiente podrían contribuir en alguna medida a reforzar las hipótesis.

Su distribución en los diferentes ecotopos los destacan diferencias en la abundancia entre los del estrato horizontal (domicilio y peridomicilio) con los del extradomicilio, en el estrato vertical (base y altura) en capturas simultáneas. Estas observaciones fueron referidas por otros autores en Brasil, las cuales serán fuente de consulta con los resultados finales, ya que en Argentina aún no hay publicaciones al respecto, al menos con este diseño.

El análisis final de los resultados permitirán determinar el grado de asociación entre estos ambientes con los factores abióticos ambientales pudiendo generar nuevas hipótesis para mejor comprensión como los realizados en otras regiones del país (Quintana et al. 2012).

BIBLIOGRAFÍA

1. Galati EAB, 2003. Classificação de Phlebotominae Bianchi Galati EA, In: Flebotomíneos de Brasil Rangel EF and Lainson R Eds, FIOCRUZ Editora, Rio de Janeiro, pp 23-52.
2. Marcondes CB. 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomological news* 118 (4):351-356.
3. Quintana María Gabriela, María Soledad Fernández, Oscar Daniel Salomón. 2012. Distribution and Abundance of Phlebotominae, Vectors of Leishmaniasis, in Argentina: Spatial and Temporal Analysis at Different Scales. *Journal of Tropical Medicine*. Vol 2012. Article ID 652803, 16 pages.
4. Rangel, EF, Lainson, R. Ecologia das leishmanioses. En: Rangel, EF, Lainson, R, eds. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003:291-336.
5. Rosa JR, Oscar D Salomon, José D Andrade Filho, Gustavo ML Carvalho, Enrique A Szelag, Marina Stein, Eliana S Tapia, Reginaldo P. 2010. Distribution of Sandflies (Diptera: Psychodidae) in the province of Chaco, Argentina. Brazil. *Neotrop Entomol* 39(2):303-305
6. Rosa J, Salomon OD, Andrade Filho J, Carvalho G, Szelag EA, Stein M, Tapia E, Brazil R. Distribution of Sandflies (Diptera: Psychodidae) in the province of Chaco, Argentina. 2010. *Neotrop Entomol* 39(2):303-305
7. Rosa J, Pita Pereira D, Peçanha Brazil R, Andrade Filho J, Salomón O, Szelag E. 2012. Natural infection of *cortelezzii* complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with *Leishmania braziliensis* in Chaco, Argentina. *Acta Tropica* 123: 128-131.
8. Salomón O.D.; Rosa J.R.; Stein M.; Quintana M.G.; Fernández M.S.; Visintin A.M.; Spinelli G.R.; Bogado de Pascual M.M.; Molinari M.L.; Morán M.L.; Valdez D.; Romero B.M. (2008). Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) fauna in the Chaco region and Cutaneous Leishmaniasis transmission patterns in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 103 (6):578-584.
9. Sudia y Camberlain 1962. Battery operated light traps an improved model. *Mosquito News* 22:126-129. En: Azevedo ACR, Souza NA, Memeses C, Costa WA, Costa SM, Lima JB, Rangel EF. 2002. In: Ecology of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the North or the State of Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97(4):459-464

AJUSTE, VALIDACIÓN Y ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO A/G -1082 DEL GEN *IL10* EN PACIENTES CON HEMOFILIA A SEVERA. SU RELACIÓN CON LA FORMACIÓN DE INHIBIDOR DEL FACTOR VIII TERAPÉUTICO.

Liliana Carmen Rossetti, Miguel Martín Abelleyro, Miguel Candela.
Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET – Academia Nacional de
Medicina de Buenos Aires.

RESUMEN

La hemofilia A (HA) es una coagulopatía hereditaria ligada al X que afecta 1:5000 varones causada por mutaciones deletéreas en el gen del FVIII (*F8*). La sustitución del factor ausente permite tratar al hemofílico con eficacia. Sin embargo, el desarrollo de inhibidor del FVIII terapéutico torna inefectiva la terapia afectando al 20-30% de los pacientes con HA severa. El desarrollo de inhibidor en hemofilia es considerado un rasgo multifactorial, involucrando factores genéticos y ambientales.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar otros factores genéticos que predisponen al desarrollo de anticuerpo inhibidor en hemofilia; para ello se abordó la caracterización completa de la mutación causal en 350 pacientes Argentinos con HA severa (series histórica y prospectiva), se compilaron los datos clínicos para su correlación estadística y también se puso a punto y validó la técnica de análisis del SNP -1082 A>G del gen *IL10* mediante un abordaje de PCR alelo-específica. Luego se investigó el genotipo polimórfico sobre el SNP -1082 A>G del gen *IL10* (rs1800896) en población estratificada por tipo de mutación (Inv22) en pacientes Argentinos con HA severa, en las series histórica y prospectiva, y en población control normal Argentina. Los pacientes con HA severa fueron analizados en cuanto a su potencial asociación estadística entre el desarrollo de Ac anti FVIII y la presencia del alelo G (considerado de riesgo), en condición homocigota [G/G] o heterocigota [G/A]. La población control normal, permitió conocer las frecuencias alélicas de este marcador en nuestra población.

En contraste con un estudio europeo, no se observaron asociaciones estadísticas entre los alelos de riesgo del polimorfismo de *IL10* con el riesgo a desarrollar inhibidor.

En conclusión, nuestros resultados permitieron determinar en nuestra población que el tipo y ubicación de la mutación causal de hemofilia en el *F8* es el factor genético más influyente para desarrollar inhibidor.

INTRODUCCIÓN

La Hemofilia es una coagulopatía hereditaria, ligada al cromosoma X, que afecta a 1 cada 5000 varones nacidos y se clasifica en dos tipos indistinguibles clínicamente: Hemofilia A (HA) debida defectos en el gen del factor VIII de coagulación (*F8*) y Hemofilia B (HB), en el factor IX. La HA puede subclasificarse según su severidad clínica y bioquímica en severa (FVIII:C < 1 IU/dl), moderada (2-5 IU/dl) o leve (5-20 IU/dl). La caracterización de la mutación causal constituye aún hoy un desafío en caso de HA debido al gran tamaño (187kb) y complejidad estructural (26 exones) del *F8* (Gitschier et al, 1984). La inversión del intrón 22 (Inv22) (Naylor et al, 1993; Lakich et al, 1993) y del intrón 1 (Inv1) (Bagnall et al, 2002) son las únicas mutaciones recurrentes, causando el 42% (Antonarakis et al, 1995) y el 2% (Rossetti et al, 2004) de las HA severas, respectivamente. En todo el resto de las hemofilias (HA y HB) encontramos todo tipo de mutaciones incluyendo grandes y pequeñas deleciones o inserciones y mutaciones puntuales asociadas a cambios deletéreos tipo *missense*, *nonsense* y del *splicing*.

A diferencia de los afectados por otras enfermedades genéticas, los hemofílicos son tratados satisfactoriamente por sustitución intravenosa del factor de coagulación faltante, permitiendo una expectativa y calidad de vida normales. Sin embargo, el desarrollo de anticuerpo inhibidor (Aci) del factor deficiente es la complicación más seria en la terapia sustitutiva. Aproximadamente el 30% de los pacientes con HA y el 5% con HB severa desarrollan Aci contra el factor terapéutico (Oldenburg et al, 2006). La terapia de pacientes con inhibidor suele generar problemas permanentes que afectan seriamente la salud y la calidad de vida, y requiere intervención médica y farmacéutica en extremo costosa.

El desarrollo de Aci es un típico rasgo genético multifactorial, con un aporte significativo de factores ambientales. En este sentido, la relación más fuerte que se ha encontrado es con el tipo de mutación causal. Por ejemplo, grandes deleciones, mutaciones *nonsense* y grandes rearrreglos presentan de alto a moderado riesgo relativo de desarrollar inhibidor, mientras que mutaciones tipo *missense*, pequeñas deleciones/inserciones y mutaciones

que afectan el proceso de *splicing* presentan, en general, un bajo riesgo. Sin embargo, se ha observado que algunos pacientes con mutaciones de alto riesgo no desarrollan inhibidor, poniendo en evidencia que aún faltan encontrar otros factores de predisposición.

Con este estado del conocimiento, se hace evidente la necesidad de hallar factores genéticos adicionales. Estos factores genéticos, posiblemente estén relacionados a la regulación de la respuesta inmune. En HA, fueron encontrados varios polimorfismos presentes en el gen *CTLA4* (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) que codifica para una molécula coestimulante, (-318 C/T); en el gen del *TNFA* (*tumor necrosis factor-α*) c.-308A>G (G fue asociado a alto riesgo) y en el gen de *IL10* (*interleukin 10*), que promueven la transcripción y secreción de citoquinas que estimularían la producción de Acl contra el FVIII exógeno (Astermark 2006 a, b).

El Laboratorio de Genética Molecular de la Hemofilia ha generado en los últimos años una serie de resultados en la investigación de factores predisponentes a desarrollar inhibidor (*CTLA4*: -318 C/T; *TNFA* -308 A/G). En este escenario, el análisis de polimorfismo de nucleótido simple (SNP, *single nucleotide polymorphism*) en el gen de *IL10*; específicamente el SNP -1082 A>G (rs1800896) y su potencial asociación con el desarrollo de Acl en pacientes Argentinos con HA severa con y sin desarrollo de Acl y los diferentes tipos de mutaciones causales de HA constituye un área de investigación potencialmente interesante y aún no explorada.

Con el objetivo de determinar otros factores genéticos que predisponen al desarrollo de anticuerpo inhibidor de la terapia sustitutiva del factor ausente en hemofilia, en este trabajo se abordó la caracterización completa la mutación causal en 350 pacientes Argentinos con HA severa (serie histórica y prospectiva), se compilaron los datos clínicos para su correlación estadística y también se puso a punto y validó la técnica de análisis del SNP -1082 A>G del gen *IL10* mediante el abordaje de amplificación por PCR alelo-específica. Luego se investigó el genotipo polimórfico sobre el SNP -1082 A>G del gen *IL10* (rs1800896) en población estratificada por tipo de mutación (Inv22) en pacientes Argentinos con HA severa, en las series histórica y prospectiva, y en población control normal Argentina. Los pacientes con HA severa fueron analizados en cuanto a su potencial asociación estadística entre el desarrollo de Acl anti FVIII y la presencia del alelo G (considerado de riesgo), en condición homocigota [G/G] o heterocigota [G/A]. La población control normal, permitió conocer las frecuencias alélicas de este marcador en nuestra población.

El conocimiento de las relaciones genotipo/fenotipo y la determinación de factores condicionantes de la respuesta del paciente hemofílico a las costosas terapias antihemofílicas, constituye un área de importancia significativa para la administración de los sistemas de salud del mundo desarrollado y más aún en los países en vías de desarrollo donde los recursos son limitados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones y muestras estudiadas

Se analizaron muestras de 350 pacientes con hemofilia A severa y mujeres de la familia. De cada paciente se computó la información bioquímica (tipo y título de inhibidor si lo hubiera; la actividad del factor involucrado FVIII:C) e información clínica (historias de sangrado, tipo y protocolos terapéuticos).

La población estudiada se clasificó por su status de inhibidor en: T (transientes, inhibidor generalmente da baja respuesta y que desaparece espontáneamente en un tiempo menor a 6 meses), LR (*low responders*, o de baja respuesta con títulos entre 1–5 UB/mL) y HR (*high responders*, o de alta respuesta cuando el título es >5 UB/mL).

También fueron estudiadas muestras de 101 individuos control de la población Argentina general (descrita en De Brasi et al, 2003).

El DNA genómico fue obtenido a partir de leucocitos de sangre periférica por extracción en fenol-cloroformo o *salting out* y precipitación alcohólica. La concentración, calidad y pureza de las muestras de DNA fueron evaluadas por electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría UV (260/280 nm).

Algoritmo de análisis molecular en el F8:

Mediante la aplicación de este algoritmo se realizó la determinación de la mutación causal en los probandos con Hemofilia A. Se analizó primero la presencia de las grandes inversiones que afectan al gen del *F8*, la Inv22 e Inv1, mediante la técnica de IS-PCR (Rossetti et al, 2008). Brevemente, IS-PCR incluye: ⁽¹⁾ la restricción con BclI de las muestras de DNA genómico, ⁽²⁾ ligación en gran volumen (400ul) de los fragmentos BclI (autoligación) para obtener círculos-B y ⁽³⁾ análisis de los círculos-B por 2 pruebas PCR estándar: prueba diagnóstica (*primers* ID con IU, 2U y 3U) y complementaria (*primers* ED con IU, 2U y 3U).

La inversión del intrón 1 del *F8*, (Inv1) fue estudiada por IS-PCR, sobre el mismo sustrato ya preparado para investigar la Inv22 en aquellos pacientes

con HA severa que resultaron no informativos para la Inv22 (Rossetti et al, 2008). Básicamente, se realiza un ensayo PCR adicional de los círculos-B: Inv1 prueba diagnóstica (*primers* 1-ID con 1-IU y 1-ED).

En casos de HA, todavía no informativos se realizó un *screening* primario o *prescreening*. Todas las secuencias exónicas relevantes del *F8* (región promotora, 26 exones y consensos asociados al *splicing*) fueron amplificadas por PCR en 37 amplímeros, cuyos tamaños y diseño de *primers* se realizó con el objetivo de someterlos al método de *screening* de mutaciones pequeñas elegido, CSGE (*conformation sensitive gel electrophoresis*). La identidad y tamaño de estos amplímeros fue analizada por electroforesis en gel de agarosa (1,5%). En este contexto, las deleciones grandes son definidas como la ausencia repetida (por lo menos en 3 ensayos de PCR independientes) y consistente de un grupo de secuencias exón-específicas contiguas.

Después de la detección de grandes deleciones fue abordado el *screening* de mutaciones pequeñas (pequeñas ins/del y sustituciones de 1 nucleótido) mediante CSGE. Los amplímeros del *F8* son electroforetados como fue descrito (Rossetti et al, 2007). Brevemente, los amplímeros de muestras clínicas y controles no-mutados son mezclados para formar heterodúplex y electroforetados por 17 hs, a 400V, en geles de poliacrilamida al 12% (99:1, acrilamida:bisacrilamida) en condiciones medianamente desnaturalizantes (10% etilena glicol, 15% formamida deionizada) de alta resolución (41x33x 0.08cm).

Los productos PCR indicados como anómalos por CSGE (exhibiendo un patrón diferente al control), fueron purificados por cromatografía en columna usando *Concert Gel Extraction System* (Gibco BRL) o similar; y sometidos a secuenciación de DNA automática-fluorescente.

Para determinar si el cambio genético encontrado corresponde a la mutación causal de la hemofilia se aplicaron los criterios internacionales vigentes.

Análisis del polimorfismo SNP -1082 [G/A] del gen de IL10 humano:

Se realizó la puesta a punto de las reacciones de amplificación para genotipificar el polimorfismo [G/A], ubicado en la posición -1082 bp dentro de la región promotora del gen *IL10*, basados en el método descrito por Zheng et al (2001), mediante amplificación por PCR-aleoespecífica, seguida de un análisis electroforético en geles de agarosa al 1,5%.

El ajuste de las condiciones de amplificación PCR aleoespecífica, en particular encontrar la temperatura de hibridación específica que permita discriminar los alelos A y G del SNP mediante el uso de *primers* que difieren sólo

en ese nucleótido específico, se realizó mediante el uso de un termociclador equipado con gradientes térmicos (BIOER 9600). Debido a que se esperaban frecuencias alélicas cercanas a $\frac{1}{2}$ para A y G, no resultó un problema encontrar los tres genotipos control (i.e., A/A, A/G y G/G).

Análisis Estadístico:

Las pruebas de hipótesis estadísticas sobre tablas de contingencia del tipo Caso (pacientes con inhibidor, sean LR o HR) vs Control (pacientes sin inhibidor, sean negativos o transientes) incluyeron Chi cuadrado con la corrección de Yates y Fisher exacto mediante el software GraphPad Prism 4.0 y/o SPSS 17. Asimismo se calcularon los OR asociados a cada alelo del sistema bialélico con su correspondiente intervalo de confianza al 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Genotipificación y análisis del polimorfismo SNP -1082 [A/G] del gen de IL10 humano en pacientes con Hemofilia A severa con y sin Inhibidor y en población control normal Argentina.

En el presente estudio, se analizaron muestras de 350 pacientes con HA severa en los que se caracterizó la mutación causal, que incluyeron las series histórica y prospectiva.

En principio se estudió el SNP -1082 [G/A] del gen de *IL10* humano sobre 101 ADNs de controles normales, provenientes de la biblioteca de ADN descrita en De Brasi 2003, que permitió determinar las frecuencias alélicas y genotípicas en nuestra población; se observaron las frecuencias alélicas: A = 114 (0.564) y G = 88 (0.436); y las frecuencias genotípicas A/A = 40 (0.396); A/G = 34 (0.336) y G/G = 27 (0.267). Además también se obtuvieron así controles de amplificación de los 3 genotipos posibles, que fueron secuenciados con *primers* externos, para corroborar la especificidad de la PCR para ambos alelos, y que entonces fueron siempre incluidos en todas las reacciones de PCR posteriores.

Luego, se analizó el SNP en población estratificada por mutación (sólo casos positivos para la Inv22, la mutación más prevalente en hemofilia) sobre pacientes con HA severa en las series histórica y prospectiva (nuevos casos incorporados con la Inv22). Se analizaron 141 casos en total, y se observaron los genotipos AG en 62 individuos, AA en 62 y GG en 17 casos.

Se observó desarrollo de inhibidor en 53/141 pacientes con HA severa e Inv22, correspondiendo a un 38% de los casos, dato acorde dado que este tipo de mutación es considerada de riesgo moderado-alto en cuanto al desarrollo de inhibidor. El status de inhibidor observado en este grupo correspondió a: 39 HR, 14 LR, 8 T y 80 negativos.

Análisis estadístico del polimorfismo en el gen de IL10 e Inhibidor

Se realizó el análisis estadístico para evaluar la potencial asociación del SNP -1082 [A/G] ubicado en la región promotora del gen de *IL10* humano, a la predisposición de desarrollo Acl anti FVIII y la presencia del alelo G (considerado de riesgo), en condición homocigota [G/G] o heterocigota [G/A]. Para ello, se analizaron 141 pacientes informativos para la INV22 (282 alelos) con HA severa considerando los 3 genotipos por separado (Figura 1), y no se halló asociación estadística de las variables en las tablas de contingencia.

Luego se realizó el análisis considerando la presencia del alelo G (asociado a riesgo) [G/G + G/A] y tampoco se obtuvieron diferencias significativas (Figura 2), sugiriendo que este marcador no se encuentra asociado al desarrollo de Acl anti FVIII en población argentina con HA severa.

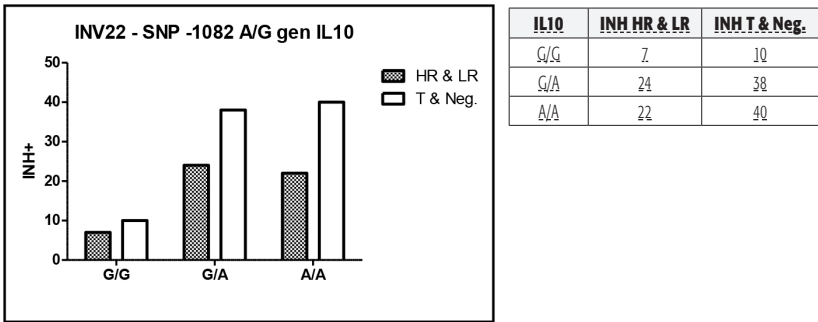


Figura 1: Distribución de los alelos IL10: SNP-1082 A/G (G asociado a riesgo), en pacientes con HA severa con y sin inhibidor.

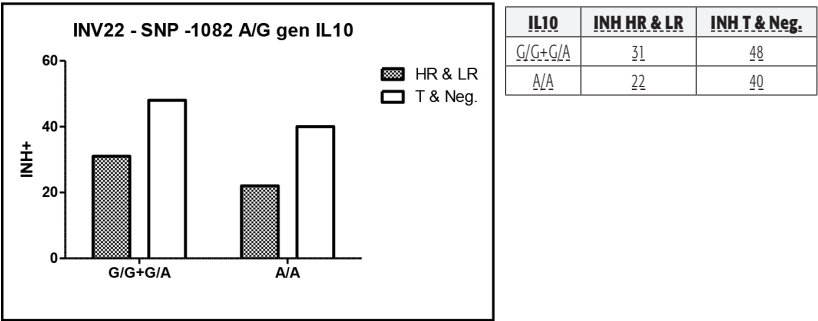


Figura 2: Distribución del alelo IL10: SNP-1082 G (asociado a riesgo) en pacientes con HA severa con y sin inhibidor.

Además, se analizó la potencial asociación de alguna de las variantes alélicas entre población con hemofilia A severa estudiada y los controles normales, y no se obtuvieron diferencias significativas (Figura 3), sugiriendo que los diferentes genotipos se encuentran igualmente distribuidos en ambas poblaciones.

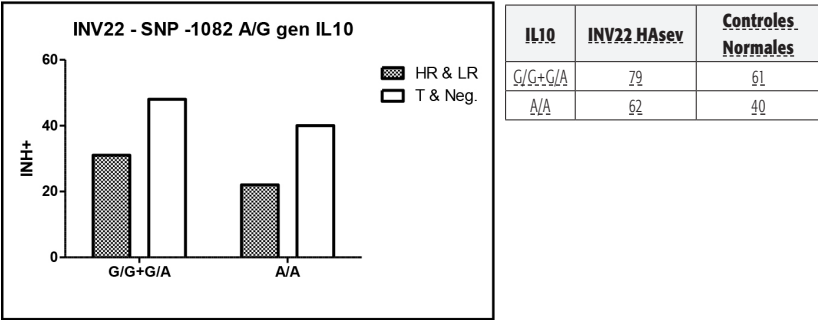


Figura 3: Distribución del alelo IL10: SNP-1082 G (asociado a riesgo) en pacientes con HA severa Inv22 y en controles normales.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados permiten determinar en nuestra población que el tipo y ubicación de la mutación causal de hemofilia en el *F8* es el factor gené-

tico más influyente para el desarrollo de inhibidor. En nuestra población, a diferencia de los datos observados en la literatura, no hemos podido confirmar la asociación reportada entre la propensión al desarrollo de inhibidor y el polimorfismo analizados en el gen *IL10*.

REFERENCIAS

1. Antonarakis SE, and a consortium of more than 50 international authors. FVIII gene inversions in severe haemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 1995; 86: 2206-2212.
2. Astermark^a J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the TNFA and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; 108: 3739-45.
3. Astermark^b J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK; MIBS Study Group. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; 107: 3167-72.
4. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a quent cause of severe Hemophilia A. *Blood* 2002; 99:168-174.
5. De Brasi CD, Rossetti LC, Larripa IB. Rapid genotyping of XbaI and MspI DNA polymorphisms of the human factor VIII gene: estimation of their combined heterozygosity in the Argentinean population. *Haematologica* 2003; 88:232-4
6. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312: 326-345.
7. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE & Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe Haemophilia A. *Nature Genetics* 1993; 5: 236-241.
8. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F Characteristic mRNA abnormality found in half the patiens with severe Haemophilia A is due to large inversions. *Hum Molec Genet* 1993; 2: 1773-1778.
9. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitor to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006; 12:15-22.
10. Rossetti LC, Candela M, Perez Bianco R, Tezanos Pinto M, Western A, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Analysis of FVIII gene intron 1 inversion in Argentinean families with severe haemophilia A and a review of the literature. *Blood Coagul Fibrinol* 2004; 15: 569-572.
11. Rossetti LC, Radic CP, Candela M, Pérez Bianco R, de Tezanos Pinto M, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Sixteen novel hemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defects. *Haematologica*. 2007 Jun; 92(6):842-5.

12. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 830–836.

ABSTRACT

Hemophilia A (HA) is an X-linked bleeding disorder affecting 1 in 5,000 males in all human populations associated with deleterious mutations in the coagulation factor VIII (F8) gene. The development of inhibitory antibodies is a serious complication that occurs in 20-30% of patients with HA in response to replacement therapy with the deficient factor. The inhibitor development is considered a multifactor risk involving both, genetic and environmental factors.

This study aimed to identify other genetic factors that predispose to the development of inhibitory antibody in haemophilia, for this, we addressed the complete characterization of the causal mutation in 350 patients with severe HA from Argentina (historical and prospective series), clinical data were compiled for statistical correlation, and also attuned and validated the analysis of the SNP -1082 A>G IL10 by gene amplification by using allele-specific PCR. Genotype on the polymorphic SNP -1082 A>G of IL10 (rs1800896) gene in population stratified by type of mutation (Inv22) of Argentinean patients with severe HA, (historical and prospective series), and an Argentine normal control population, was investigated. Patients with severe HA were analyzed for their potential statistical association between the development of anti FVIII inhibitor antibodies and the presence of the G allele (risk considered), in homozygous condition [G/G] or heterozygous [G/A]. The normal control population allowed knowing allele frequencies of this marker in our population.

In contrast with a North European study, no statistical association was found between the risk polymorphic alleles in IL10 and inhibitor development.

In conclusion, our results allow suggest in our population that the type and location of the causative mutation of hemophilia in the F8 is the more influent factor in the development of inhibitor.

EVALUACIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS Y CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER COMO POSIBLES MARCADORES PRONÓSTICO EN TUMORES PRIMARIOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

O. Graciela Scharovsky, Viviana R. Rozados, María José Rico
Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad
Nacional de Rosario

INTRODUCCIÓN

La incidencia de cáncer de mama está aumentando mundialmente. La incidencia y la mortalidad por este tipo de cáncer varían considerablemente según la región del mundo. En general, la incidencia es alta (más de 80/100.000 individuos) en regiones desarrolladas del mundo y baja (menos de 30/100.000), aunque en aumento, en las regiones en desarrollo. El rango de las tasas de mortalidad es mucho menor (alrededor de 6,23/100.000), a causa de la supervivencia más elevada en pacientes con cáncer de mama en las regiones desarrolladas (Parkin DM & Fernández LM, 2006). La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) informó que durante el año 2008, en la Argentina, se produjeron 104.859 nuevos casos de tumores malignos (excluyendo aquellos localizados en piel y con histología distinta al melanoma). Esta estimación corresponde para ambos sexos, con una incidencia de 206 casos nuevos/año/100.000 individuos. Según esta publicación, el cáncer de mayor incidencia en mujeres es el de mama, con una tasa de 74 casos por cada 100.000 mujeres constituyendo la mayor causa de muerte por cáncer en mujeres argentinas. (Instituto Nacional del Cáncer Información para Equipos de salud Análisis de situación del cáncer en la Argentina. http://www.msal.gov.ar/inc/equipos_analisis.asp). De esos datos surge la necesidad de mejorar la eficacia de los tratamientos con que se cuenta en la actualidad y una de las formas de lograrlo es encontrar marcadores pronóstico de respuesta a las terapias, que ayuden a identificar el mejor método terapéutico para cada paciente individual.

La mayoría de los cánceres están formados por diferentes subpoblaciones celulares, muy heterogéneas, con diferencia en su potencial proliferativo, en su inmunogenicidad, en su susceptibilidad a diferentes agentes terapéuticos, así como en su capacidad para reconstituir el tumor luego de trasplanta-

do. Una de esas subpoblaciones es la de las células madre del cáncer (CMC). Las CMC son células con capacidad de auto-renovación, que se dividen para generar otra CMC y una célula que da lugar a tipos fenotípicamente distintos de células tumorales. Estas células fueron primeramente descubiertas en tumores hematológicos. Pueden aparecer luego de mutaciones en células madre específicas, en células progenitoras o aún en células diferenciadas (Bjerkvig R et al, 2005). Las CMC migrantes, capaces de realizar la transición epitelio-mesénquima, serían las responsables de las recidivas y del desarrollo de metástasis (Brabletz Tet al, 2005; Abell AN & Johnson GL, 2014). Estas células constituyen solo una pequeña fracción de la población celular tumoral y, generalmente, son resistentes a las terapias anti-cáncer estándar (Jones RJ, 2009; Luo M et al, 2014). Dado que en trabajos recientes se demostró la posibilidad de actuar terapéuticamente contra este tipo celular tan importante (Sigurdsson V et al, 2011; Londoño-Joshi AI et al, 2012), resulta interesante estudiar su presencia en los tumores primarios (Filipova A et al, 2014) y analizar la factibilidad de que en forma individual, o combinada con otros factores pronóstico, puedan ser útiles en clasificar diferentes grupos de pacientes e, inclusive orientar en la elección de las terapias a implementar.

Las células supresoras mieloides (MDSCs) constituyen una población heterogénea de células mieloides inmaduras entre las que se encuentran los macrófagos inmaduros, granulocitos y células dendríticas, entre otras (Youn JI & Gabrilovich DI, 2010). En ratones, esta población celular está definida como células Gr-1⁺CD11b⁺ (Kusmartsev S & Gabrilovich DI, 2002). En humanos se definen como células CD33⁺HLA-DR⁺, se encuentran aumentadas en la sangre de los pacientes con cáncer avanzado e inhiben la producción de citoquinas Th1 (Almand B et al, 2001). También se ha encontrado un número elevado en enfermedades infecciosas, trauma y sepsis. Las MDSCs se caracterizan por su origen mieloides, su estado inmaduro y por su capacidad de suprimir distintas funciones de la respuesta inmune, especialmente la proliferación de células T y la producción de citoquinas (Tadmor T et al, 2011; Lu T et al, 2011). Aun cuando se desconoce el mecanismo implicado en la expansión y el reclutamiento de las MDSCs inducidas por el tumor, se demostró la diferenciación de monocitos en MDSCs intratumorales, dependiente de TGF- β lo cual, a su vez, inhibiría las respuestas antitumorales mediadas por células T (Valenti R et al, 2006).

Teniendo en cuenta los antecedentes citados, el objetivo del presente trabajo consiste en evaluar la utilidad de las células mieloides supresoras (MDSC) y las células madre del cáncer (CMC) como posibles factores pronós-

tico de respuesta al tratamiento quimioterapéutico en pacientes con cáncer de mama, determinando su presencia en los tumores primarios y analizar su relación con otros marcadores tumorales, en material de archivo de pacientes con cáncer de mama, que recibieron tratamiento quimioterapéutico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se analizaron tumores primarios, incluidos en parafina, en material de archivo de pacientes con cáncer de mama, principalmente en estadio II, las cuales tenían un seguimiento no menor de 5 años; esto permitió establecer si existía asociación ente la presencia del marcador y la respuesta a la terapia. Se recolectó un total de 36 muestras, de las cuales, 32 estaban en condiciones apropiadas para hacer la determinaciones programadas.

Células mieloides supresoras (MDSC)

Se evaluó por microscopía de fluorescencia la cantidad de MDSC intra-tumorales utilizando como marcadores anticuerpos para las proteínas CD33 y CD11b con el objeto de identificar las células MDSC, las cuales presentan el fenotipo CD33⁺CD11b⁺. Se procedió de igual manera que con las CMC, utilizando los anticuerpos CD33 (eBioscience) en el primer día y CD11b (R&D Systems) en el segundo.

Células madre del cáncer (CMC)

Se evaluó por microscopía de fluorescencia la cantidad de CMC intra-tumorales utilizando como marcadores anticuerpos para las proteínas CD44 y CD24 ya que las CMC se definen como células CD44⁺CD24^{low/-}. Se procedió de la siguiente manera: se trabajó con cortes histológicos de 4 µm de espesor, que fueron desparafinados; luego se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena usando H₂O₂ y las reacciones no específicas con suero normal. Posteriormente, los cortes fueron incubados durante toda la noche a 4°C con Anti CD24 (Abcam). Al segundo día, se incubaron con anticuerpo biotinilado y posteriormente con PE-Estreptavidina. Luego se incubó toda la noche con Anti CD44 (BD Pharmingen™). Al tercer día se incubaron nuevamente con anticuerpo biotinilado y con Alexa Fluor-Estreptavidina (Invitrogen). Los cortes se deshidrataron y montaron en la oscuridad. Como control positivo para los dos antígenos se utilizaron cortes de tejido ovárico.

Cuantificación

Las células marcadas positivamente se evaluaron en 10 campos 40X en microscopio de fluorescencia en los que las células marcadas positivamente se cuantificaron utilizando el siguiente score: 0 (nulo), 2 (bajo), 4 (intermedio) y 6 (alto).

Consideraciones éticas

Se procedió en un todo de acuerdo con las normas establecidas por el Comité de Bioética institucional, asegurándose la confidencialidad de los datos de archivo que se utilizaron en este proyecto (Ley de Habeas Data N° 25326).

Diseño y análisis estadísticos

Este es un estudio observacional, retrospectivo basado en muestras de tejido de cáncer primario de mama para determinar biomarcadores que puedan predecir los resultados clínicos en pacientes con cáncer. De acuerdo a su historia clínica y los resultados a los 5 años del tratamiento primario, cada paciente fue asignado a uno de dos grupos principales: Libres de enfermedad o recaída.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente con test no paramétricos, Se realizaron correlaciones entre el valor obtenido y distintas variables. Los resultados fueron considerados significativos cuando $P < 0.05$.

Logistic Regression

En análisis subsiguientes las variables estudiadas (MDSC, CMC), junto con otras analizadas anteriormente (linfocitos infiltrantes, CD4, CD8, Foxp3) y los datos obtenidos de las historias clínicas (Receptor de Estrógeno, Receptor de Progesteron, y Her-2/neu) se consideraron simultáneamente en un análisis de regresión logística múltiple usando algoritmos de eliminación hacia adelante y hacia atrás para evaluar predictores independientes significativos, analizando el efecto de cada medición individual sobre el riesgo de recurrencia. El nivel de significancia P para detener el proceso de selección se fijó en 0.10. Los cálculos se realizaron utilizando el software estadístico STATA:

RESULTADOS

Datos clínico-patológicos de las pacientes

Analizando las historias clínicas de las pacientes con seguimiento de, al menos 5 años, cuyos tumores primarios fueron objeto de nuestro estudio, se obtuvieron los datos que se muestran en las Tablas 1 y 2.

Se registraron diversos datos demográficos tales como histología del tumor, estadio, presencia de receptores de estrógenos, receptores de progesterona y HER2/neu. (Tabla 1). Como se puede observar, la mayoría de las pacientes presentaron adenocarcinomas de mama de tipo ductal en estadio II. El tipo de tumores, en cuanto a la presencia o ausencia de receptores hormonales y de HER2/neu fue variado y solo dos tumores resultaron de la variedad triple negativo, mientras que no se contó con los datos de RE y RP de 3 tumores y de HER2/neu de 4 de ellos.

Asimismo, en la Tabla 2, se muestran los tratamientos recibidos por las pacientes y la respuesta a dichas terapias, indicando la condición de la paciente a los 5 años del tratamiento primario como: a) libre de enfermedad, ó b) recaída.

Tabla 1. Datos clínico-patológicos de las pacientes

Paciente N°	Histología	Estadio	RE	RP	Her2/neu
1	Car. Ductal	II	-	-	+
2	Car. Ductal	II	+	-	-
3	Car. Ductal Infiltrante	I	+	+	-
4	Car. Ductal	II	+	+	-
5	Car. Ductal	II	+	+	-
6	Car. Ductal	II	+	+	+
7	Car. Ductal Infiltrante	II	+	+	-
8	Car. Ductal Infiltrante	I	s/d	s/d	-
9	Car. Ductal Infiltrante.	II	+	-	-
10	Car. Ductal	II	+	+	-
11	Car. Ductal Infiltrante	II	+	-	-
12	Car. Ductal Infiltrante	I	+	+	+
13	Car. Ductal	II	-	-	+
14	Car. Ductal	II	+	+	-
15	Car. Ductal <i>in situ</i>	II	+	+	+
16	Car. Lobulillar Infiltrante	II	-	-	-

Paciente N°	Histología	Estadio	RE	RP	Her2/neu
17	Car. Ductal Infiltrante	II	-	-	+
18	Car. Ductal Infiltrante	II	-	-	-
19	Car. Ductal Infiltrante	II	+	-	+
20	Car. Ductal Infiltrante	II	+	-	+
21	Car. Ductal	II	+	-	-
22	Car. Ductal Infiltrante	II	+	+	+
23	Car. Ductal	II	+	-	-
24	Car. Ductal	II	+	+	+
25	Car. Ductal	II	-	-	+
26	Car. Ductal	II	s/d	s/d	s/d
27	Car. Ductal Infiltrante	II	+	+	-
28	Car. Ductal	II	-	-	+
29	Car. Lob. Infiltrante	II	-	+	-
30	Car. Ductal Infiltrante.	II	+	+	s/d
31	Car. Ductal Infiltrante	III	s/d	s/d	s/d
32	Car. Lobulillar Infiltrante	III	+	+	s/d

R: recaída; **LE:** libre de enfermedad; **Car.** carcinoma

Tabla 2. Tratamientos recibidos y respuesta a los 5 años

N°	Tratamiento	Respuesta
1	Cirug + AC x6 + RT	R
2	Cirug + AC x4 + T x4 + Tam	LE
3	Cirug + Tam	R
4	Cirug + AC x6 + Tam x 5 años	LE
5	Cirug + AC x4 + Pacli x4 + Tam	LE
6	Cirug + Tam (5y) + LHRH analog, Anastrosol	LE
7	Cirug + Tam (5 años)	LE
8	Cirug + Tam (5 años)	LE
9	Cirug + AC x6	R
10	Cirug + Anastrosol, Tam	LE
11	Cirug + Tam (5 años) + LHRH analog, Anastrosol	LE
12	Cirug + AC x4	LE
13	Cirug + AC x6, Letrosol	LE
14	Cirug + FAC + T x4 + Cape + C-Cel + RT	LE
15	Cirug + AC x4	LE
16	Cirug + AC x4, T x4	LE
17	Cirug + AC x4, T x4	LE

Nº	Tratamiento	Respuesta
19	Cirug + AC x4, T x4	LE
20	Cirug + AC x4	LE
21	Cirug + AC x4, T x4	LE
22	Cirug + AC x4	LE
23	Cirug + AC x4	LE
24	Cirug + AC x4 + T x4 + Tam	R
25	Cirug + AC x4 + T x4 + Tam	R
26	Cirug + AC x4, T x4	R
27	Cirug + AC x4	R
28	Cirug + AC x4	R
29	Cirug + T	R
30	Cirug + FAC x 6 + T	R
31	Cirug + AC x4 + T 1xsem	R
32	Cirug + T	R

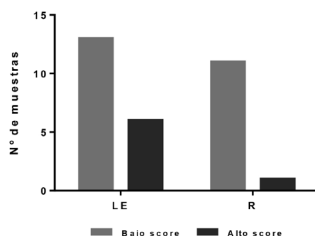
Cirug: cirugía; *AC*: adriamicina + ciclofosfamida; *RT*: radioterapia *T*: taxanos; *Tam*: tamoxifeno; *LHRH analog*: castración química; *FAC*: fluorouracilo + adriamicina + ciclofosfamida; *C-Cel*: ciclofosfamida + celecoxib; *Cape*: capecitabina; *R*: recaída; *LE*: libre de enfermedad

Marcadores tumorales

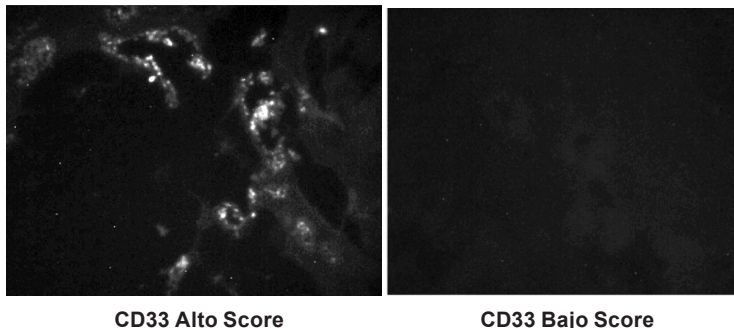
La evaluación de las células mieloides supresoras (MDSC) mostró que el 68.4% (13/19) de los tumores primarios de las pacientes LE, a los 5 años del tratamiento primario, presentaban Bajo score, mientras que en las pacientes R el porcentaje fue del 91,7% (11/12). Por otra parte, el porcentaje de tumores con Alto score fue del 31,6% (6/19) en pacientes LE y de 8,3% (1/12) en las del grupo R. Las diferencias entre ambos grupos, analizadas con el Test exacto de Fisher, no resultaron significativas (Figura 1.a).

Figura 1. Células mieloides supresoras

a)



b)



c)

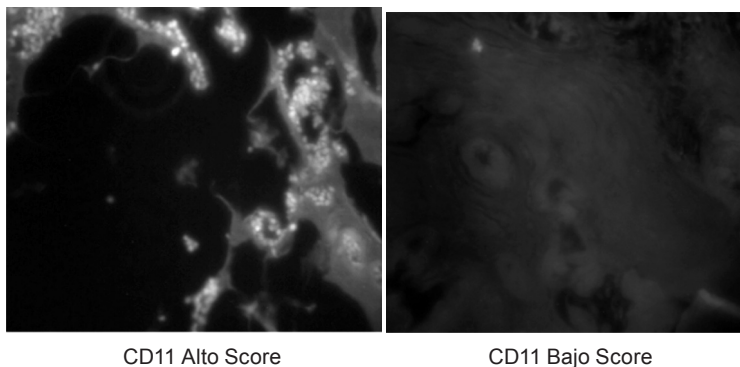


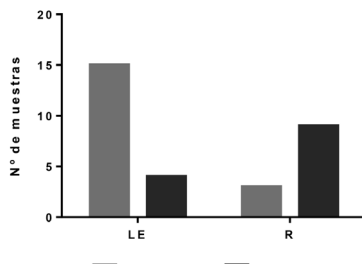
Figura 1. a) Cuantificación de células $CD33^+CD11^+$. Las muestras que presentaron nula o baja cantidad de dichas células fueron asignadas al grupo de Bajo score y las que presentaron media o alta cantidad al de Alto score, para las pacientes libres de enfermedad (LE) y las recaídas (R) a los 5 años del tratamiento primario (Test de Fisher, N.S.); **b)** Imágenes representativas de la marcación para CD33, Alto y Bajo score, en microscopio de fluorescencia (magnificación 40X); **c)** Imágenes representativas de la marcación para CD11, Alto y Bajo score, en microscopio de fluorescencia (magnificación 40X).

La evaluación de las células madre del cáncer (CSC) mostró que el 78,9% (15/19) de los tumores primarios de las pacientes LE, a los 5 años del tratamiento primario, presentaban Bajo score, mientras que en las pacientes

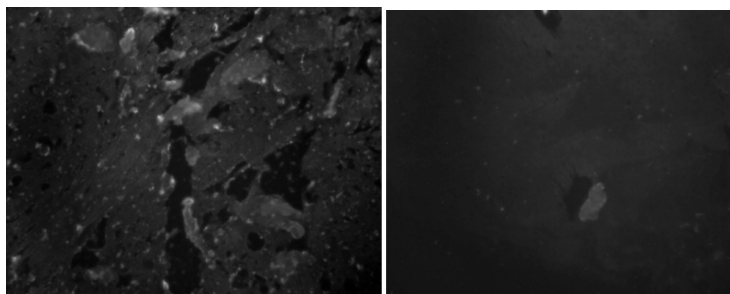
R el porcentaje fue del 25% (3/12). De manera inversa, el porcentaje de tumores con Alto score fue de 21,1% (4/19) en pacientes LE y de 75% (9/12) en las del grupo R. Las diferencias entre ambos grupos, analizadas con el Test exacto de Fisher, fueron estadísticamente significativas, $P < 0,0075$ (Figura 1.a). En la Figura 1.b se muestran imágenes representativas de las marcaciones de Alto y Bajo score para CD44 y en la Figura 1.c los controles positivos para CD44 y CD24.

Figura 2. Células madre del cáncer

a)



b)



CD44 Alto Score

CD44 Bajo Score

c)

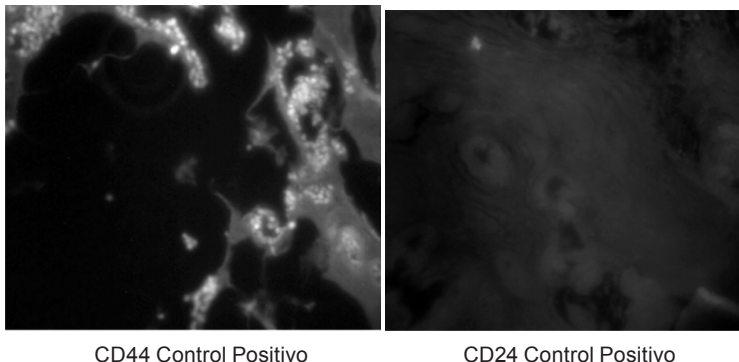


Figura 2. a) Cuantificación de células $CD44^+CD24^{low/-}$. Las muestras que presentaron nula o baja cantidad de dichas células fueron asignadas al grupo de Bajo score y las que presentaron media o alta cantidad al de Alto score, para las pacientes libres de enfermedad (LE) y recaídas (R) a los 5 años del tratamiento primario (Test de Fisher, $P=0,0075$); **b)** Imágenes representativas de la marcación para CD44, alto y bajo score, en microscopio de fluorescencia (magnificación 40X); **c)** Imágenes representativas de los controles positivos realizados en cortes de tejido ovárico para CD44 y CD24, en microscopio de fluorescencia (magnificación 40X).

En trabajos previos estudiamos, en los tumores de este mismo grupo de pacientes una serie de marcadores tales como infiltrado linfocitario (IL), células $CD4^+$, $CD8^+$, $Foxp3^+$ y $CD34^+$. Encontramos que los niveles de linfocitos $CD4^+$ eran mayores en el grupo de pacientes que presentaron recurrencias a los 5 años del tratamiento primario (Fisher test $P<0.05$).

Regresión logística

Posteriormente, utilizando los datos de los experimentos anteriores y los actuales, se realizó una regresión logística en la que se analizaron conjuntamente las siguientes características de los tumores: RE, RP, HER2/neu, IL, CD4, CD8 CD34, $Foxp3$, CSC y MDSC. Coincidentemente con los resultados obtenidos en los tests estadísticos realizados con cada variable en forma individual, el análisis multivariado identificó a las células $CD4^+$ y a las CSC como buenos predictores de la respuesta al tratamiento ($R^2=0.2834$). Para pacientes con altos niveles de células $CD4^+$, el riesgo de recurrencia aumen-

ta 9,8 veces si todas las pacientes tuvieran valores similares de CSC. A su vez, las pacientes con niveles altos de CSC, tienen un riesgo aumentado 6,3 veces si todas las pacientes tuvieran valores similares de células CD4⁺.

DISCUSIÓN

La salud es uno de los derechos fundamentales del ser humano que contribuye al bienestar familiar, al desarrollo social y económico de una nación, así como también es una condición indispensable para alcanzar una auténtica igualdad de oportunidades en la población.

Los pacientes oncológicos están expuestos a tratamientos de quimioterapia o radioterapia que pueden, muchas veces, producir efectos secundarios significativos que afectan negativamente tanto la calidad de vida del paciente como los costos en salud pública. Por ello, sería importante contar con parámetros de fácil y rápida determinación, que sirvan como factores pronóstico y de seguimiento de la enfermedad. Esto permitirá el diseño de terapias personalizadas que tendrán mayor eficacia terapéutica, evitando los tratamientos de los que, de antemano, se sabe que tienen alta probabilidad de fracasar en ese paciente. Esto también traerá aparejado una disminución de los costos terapéuticos.

En la práctica diaria, la decisión del tratamiento del cáncer de mama está basada en factores patológicos predictivos y pronósticos tales como tamaño tumoral, metástasis en ganglios linfáticos regionales, expresión de receptores de estrógenos y progesterona, de Her-2 y Ki-67 y el grado de invasión linfovascular. Actualmente, la investigación está enfocada en la búsqueda de nuevos marcadores predictivos de respuesta, para poder seleccionar mejor los tratamientos para los pacientes y para ellos tengan una mejor respuesta clínica.

En ensayos anteriores habíamos estudiado una serie de características presentes en las células del tumor primario, las cuales podrían ser marcadoras potenciales de respuesta a la terapia tales como el infiltrado linfocitario (IL) y las células positivas para CD4, CD8, Foxp3 y CD34 (Rico et al, 2012). De todas ellas, solo el nivel de las células CD4⁺ estuvieron asociadas significativamente con la respuesta a la terapia.

En el presente trabajo estudiamos, en las mismas muestras, la presencia de dos tipos celulares muy importantes en la biología de los tumores, las MDSC y las CMC.

La células mieloides supresoras (MDSCs) constituyen una población heterogénea de células mieloides inmaduras, las cuales inhiben la inmunidad innata y adaptativa. Se encuentran aumentadas en la sangre de los pacientes con cáncer avanzado y presentan una importante función inhibidora de la respuesta inmune del portador del tumor, Esto lo logran mediante mecanismos que incluyen la depleción de arginina, la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, reduciendo la producción de citoquinas Th1 que son las que colaboran con la respuesta inmune antitumoral y también mediante la secreción de citoquinas inhibitorias (Kao J et al, 2011). De Sanctis y colaboradores contribuyeron a apoyar la hipótesis de que los niveles de MDSC podrían tener valor predictivo en pacientes con cáncer (De Sanctis F et al. 2015). Por el contrario, los tumores aquí estudiados, no mostraron asociación entre los niveles de MDSC y la respuesta terapéutica. Estudios futuros podrán determinar las causas de ambos resultados, aparentemente contradictorios.

Las células madre del cáncer (CMC) son células necesarias tanto para la repoblación tumoral como para el desarrollo de metástasis y tienen diferentes implicancias en los procesos de tumorigénesis, progresión e invasión por lo que influyen, a través de esos procesos, los resultados clínicos (Mani SA et al. 2008). Las CMC se caracterizan por presentar resistencia a diversas drogas antitumorales (Dean M et al. 2005). En la actualidad se carece de tratamientos que se dirijan específicamente contra este tipo de células. Sin embargo, lentamente se empiezan a proponer diferentes aproximaciones terapéuticas tendientes a eliminar esta población celular (Ning X et al. 2013).

Interesantemente, la determinación de CMC en los tumores primarios de mama mostró una asociación muy significativa con la respuesta terapéutica del paciente. Las pacientes que habían recaído durante los 5 primeros años de la terapia primaria tenían niveles altos de células madre del cáncer comparadas con las que no lo habían hecho. Por lo tanto, las células madre del cáncer podrían convertirse en un biomarcador predictivo de la respuesta al tratamiento.

Nuestros hallazgos en este ensayo piloto mostraron resultados prometedores relacionados con la evaluación de las CMC, los cuales podrían ayudar a explicar la agresividad de ciertos tumores y su propensión a la recurrencia. Sin embargo, el mismo tiene limitaciones obvias relacionadas con el pequeño número de muestras analizadas. La determinación de esta variable en un mayor número de pacientes podrá permitir la obtención de una conclusión firme que defina su utilidad como biomarcador predictivo de respuesta a la terapia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abell AN & Johnson GL. Implications of Mesenchymal Cells in Cancer Stem Cell Populations: Relevance to EMT. *Curr Pathobiol Rep*. 2:2, 2014
2. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, Carbone DP, Gabrilovich DI. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*. 166:678, 2001.
3. Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature Reviews Cancer* 5:89, 2005.
4. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature Rev Cancer* 5:744, 2005.
5. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 5(4):275, 2005.
6. De Sanctis F, Solito S, Ugel S, et al: MDSCs in cancer: Conceiving new prognostic and therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta*, 2015, doi: 10.1016/j.bbcan.2015.08.001.
7. Filipova A, Seifrtova M, Mokry J, Dvorak J, Rezacova M, Filip S, Diaz-Garcia D Breast cancer and cancer stem cells: a mini-review. *Tumori*. 100:363, 2014
8. Instituto Nacional del Cáncer. Información para Equipos de salud, Análisis de situación del cáncer en la Argentina. http://www.msal.gov.ar/inc/equipos_analisis.asp
9. Jones RJ. Controversies in cancer stem cells. *J Mol Med* 87:1077, 2009.
10. Kao J, Ko EC, Eisenstein S, et al. Targeting immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology. *Crit Rev Oncol Hematol* 77:12, 2011.
11. Kusmartsev S & Gabrilovich DI. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol Immunother* 51:293, 2002.
12. Londoño-Joshi AI, Oliver PG, Li Y, Lee CH, Forero-Torres A, Lobuglio AF, Buchsbaum DJ. Basal-like breast cancer stem cells are sensitive to anti-DR5 mediated cytotoxicity. *Breast Cancer Res Treat* 133(2):437, 2012.
13. Lu T, Ramakrishnan R, Altiok S, Youn JI, Cheng P, Celis E, Pisarev V, Sherman S, Sporn MB, Gabrilovich D. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J Clin Invest*. 121:4015, 2011
14. Luo M, Brooks M, Wicha MS. Epithelial-Mesenchymal Plasticity of Breast Cancer Stem Cells: Implications for Metastasis and Therapeutic Resistance. *Curr Pharm Des*. 2014 Dec 11. [Epub ahead of print]
15. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 133(4):704, 2008.
16. Ning X, Shu J, Du Y, Ben Q, Li Z. Therapeutic strategies targeting cancer stem cells. *Cancer Biol Ther*. 14(4):295, 2013.
17. Parkin DM & Fernández LM. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J* 12 Suppl 1:S70, 2006.

18. Sigurdsson V, Hilmarsdottir B, Sigmundsdottir H, Fridriksdottir AJ, Ringnér M, Villadsen R, Borg A, Agnarsson BA, Petersen OW, Magnusson MK, Gudjonsson T. Endothelial induced EMT in breast epithelial cells with stem cell properties. *PLoS One* 6(9):e23833, 2011.
19. Rico MJ, Rozados VR, Herrera C, Alasino CM, Vargas Roig LM, Gago FE, Tello O, Nocito AL, Roggero E, Scharovsky OG. Tumor lymphocyte infiltration, expression of CD4, CD8, FOXP3, CD34 molecules and their relationship with tumor evolution after primary treatment in breast cancer patients. *Proc Am Assoc Cancer Res* 53:169, 2012.
20. Tadmor T, Attias D, Polliack A. Myeloid-derived suppressor cells--their role in haemato-oncological malignancies and other cancers and possible implications for therapy. *Br J Haematol.* 153:557, 2011.
21. Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Pilla L, Sovena G, Villa A, Corbelli A, Fais S, Parmiani G, Rivoltini L. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res.* 66:9290, 2006.
22. Youn JI & Gabrilovich DI. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur. J. Immunol* 40:2969, 2010.

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI-ERBB-2 EN CÁNCER DE MAMA.

María Florencia Mercogliano¹, Mara De Martino¹, Gloria Inurrigarro²,
Isabel Frahm², Roxana Schillaci¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Vuelta de Obligado 2490,
(1428) ² Sanatorio Mater Dei, Buenos Aires, Argentina

INTRODUCCIÓN

El ErbB-2 (HER2/Neu), receptor con actividad tirosina quinasa intrínseca, sobreexpresado/amplificado en el 13-20% de los cánceres de mama que originan tumores agresivos y metastásicos ⁽¹⁾. Los pacientes con tumores ErbB-2 positivos (ErbB-2+) reciben trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-ErbB-2, pero sólo el 40-60% de ellos responden, debido a fenómenos de resistencia *de novo* o adquirida ⁽²⁾. Por ello es importante el estudio de los mecanismos que puedan conferir resistencia a estas terapias, y la búsqueda de terapias que puedan superar esta resistencia.

La inflamación de bajo grado, generada por células tumorales e infiltrantes del tumor, participa en la patogénesis y progresión del cáncer de mama, y se correlaciona con mal pronóstico y aumento en el riesgo de recurrencia ⁽³⁾. Asimismo, citoquinas pro-inflamatorias pueden reducir la respuesta a quimioterapia por la activación del factor de transcripción NF-κB ⁽⁴⁾. Sin embargo, la participación de citoquinas en la resistencia al trastuzumab ha sido poco explorada. Previamente demostramos que el TNFα transactiva al ErbB-2 de forma no canónica a través de la quinasa c-Src y favorece su heterodimerización con el ErbB-3, induciendo la activación de Akt y NF-κB y la proliferación de líneas celulares humanas ErbB-2+ sensibles al trastuzumab, aún en su presencia ⁽⁵⁾. Por ello en este trabajo exploramos la participación *in vivo* e *in vitro* del TNFα en la resistencia al trastuzumab en células resistentes de novo a dicha terapia. Asimismo evaluamos la expresión de TNFα y NF-κB en carcinomas mamarios y correlacionarlos con características clínico patológicas de los pacientes.

MATERIALES Y METODOS

Líneas celulares, ensayos de proliferación celular. Las líneas celulares de cáncer de mama humano JIMT-1 proviene de la DSMZ ⁽⁶⁾ y las KPL-4 fueron gentilmente cedidas por el Dr. Kurebayashi, Kawasaki Medical School, Japón ⁽⁷⁾. Ambas fueron cultivadas en medio DMEM:F12 con 10% de suero fetal bovino. En ciertos experimentos se utilizó 10µg/ml trastuzumab (Roche) en ausencia o presencia de distintas concentraciones de etanercept (Wyeth) determinándose la proliferación por recuento celular a los 3 días de tratamiento ⁽⁸⁾.

Animales y tumores. Los experimentos, aprobados por el comité de Ética del IBYME (CE-011-2/2012), se realizaron en hembras *nude* de 8 semanas. El crecimiento tumoral se monitoreó midiendo el volumen ⁽⁸⁾.

Western blot. Se obtuvieron extractos celulares o tumorales ⁽⁸⁾ y se evaluó la expresión de distintas proteínas con los siguientes anticuerpos: fosfo NF-κB, p65NF-κB (C22B4, #4764) de Cell Signaling, y β-tubulina (Sigma).

Unión de trastuzumab. Se cultivaron las células JIMT-1 con etanercept 10 µg/ml o IgG y, luego de 48h, se realizó una inmunofluorescencia indirecta utilizando como anticuerpo primario trastuzumab y luego una Ig anti humano conjugada con isotiocianato de fluoresceína. Luego las células fueron analizadas en un citómetro de flujo Canto II (Becton Dickinson) y los datos se procesaron con el programa FlowJo.

Inmunohistoquímica (IHQ). Las inmunomarcaciones para ErbB-2, receptores de estrógenos y progesterona se realizaron como describimos⁽⁹⁾. Para las IHQ de TNFα y fosfo NF-κB se utilizaron anticuerpos ab9739 y ab86299 (Abcam) respectivamente. La tinción de TNFα fue evaluada según score: 0, sin tinción o tinción tenue <30% de las células; 1+, tinción débil a moderada ≥30%; 2+, tinción moderada > del 50%; 3, tinción intensa en >50%⁽¹⁰⁾. Consideramos positivos los score 2+ y 3+. La expresión del NF-κB fue considerada positiva cuando más del 30% de los núcleos mostraron tinción.

Pacientes. Se utilizaron 125 muestras pacientes con cáncer de mama ductal invasivo obtenidas antes del tratamiento. Los estudios fueron apro-

bados por los comités de ética del IBYME (CE-011-2/2012) y del Hospital Fernández (CODEI 2012-16). Se obtuvieron consentimientos informados de las pacientes antes de su inclusión.

RESULTADOS

El bloqueo del TNF α sensibiliza al trastuzumab a células resistentes de novo a dicho tratamiento.

Las líneas celulares JIMT-1 y KPL-4, resistentes *de novo* al trastuzumab, secretan TNF α (18 y 150 pg/ml respectivamente). Por ello las utilizamos para explorar la participación de dicha citoquina en la resistencia *de novo* al trastuzumab. Para ello las cultivamos en presencia de trastuzumab, etanercept (una proteína de fusión entre el receptor tipo 2 de TNF α con el Fc de la IgG1 humana, que bloquea al TNF α y se utiliza en artritis reumatoidea⁽¹¹⁾) o ambos anticuerpos simultáneamente. En la Figura 1 se muestra que el etanercept a una concentración de 20 y 30 μ g/ml produjo una disminución de la proliferación de las células JIMT-1 mientras que en las células KPL-4 sólo la concentración de 30 μ g/ml logró inhibir la proliferación. El trastuzumab no modificó la proliferación, como es de esperar, pero el tratamiento simultáneo con etanercept indujo una inhibición sinérgica en ambas líneas celulares comparando con el tratamiento con etanercept en forma individual. Estos resultados sugieren que el bloqueo del TNF α sensibiliza a las células resistentes *de novo* al trastuzumab a este tratamiento.

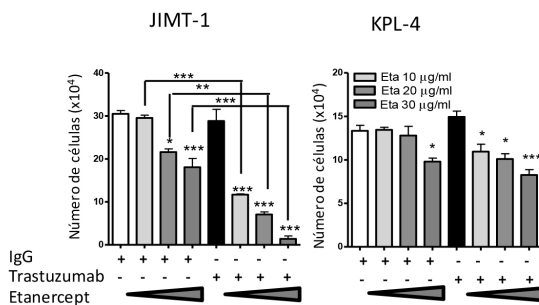


Figura 1. Proliferación de células JIMT-1 y KPL-4 en presencia de trastuzumab y/o etanercept. Las células fueron sembradas a razón de 105/pozo de P6 y se trataron con trastuzumab 10 μ g/ml o con las concentraciones indicadas de etanercept por 3 días. Luego se realizó recuento celular en cámara de Neubauer por exclusión con azul Tripán. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 ANOVA, test de Tuckey. Eta: etanercept

Para poder comprobar si esto sucede en un escenario *in vivo*, inyectamos las células JIMT-1 en ratones *nude* y, cuando los tumores se establecieron, se administró trastuzumab 5 mg/kg dos veces por semana, etanercept 5 mg/kg una vez por semana o ambos simultáneamente. Como control, un grupo de animales fue inyectado con IgG. Comprobamos que el crecimiento de los tumores JIMT-1 no se vio afectado por el trastuzumab o el etanercept, pero fue inhibido por la combinación de ambos en un 54% (Figura 2A). Como previamente comprobamos que el NF- κ B es mediador de los efectos proliferativos del TNF α *in vitro* en células de cáncer de mama ErbB2+, analizamos su activación en los extractos tumorales. Observamos que la fosforilación de NF- κ B se reduce por tratamiento con etanercept pero que alcanza su nivel más bajo con la combinación etanercept y trastuzumab. Esto sugiere que la inhibición de la activación del NF- κ B estaría involucrada en la inhibición del crecimiento tumoral observada en los tumores JIMT-1 tratados con trastuzumab y etanercept. Estos resultados evidencian que el bloqueo del TNF α es una terapia prometedora para superar la resistencia *de novo* al trastuzumab.

Uno de los posibles mecanismos que pueden explicar que la sensibilización al trastuzumab de tumores resistentes *de novo* por el bloqueo del TNF α , es que la ausencia de esta citoquina modifique la unión del trastuzumab al ErbB-2 a las células tumorales. Para ello, incubamos las células JIMT-1 con

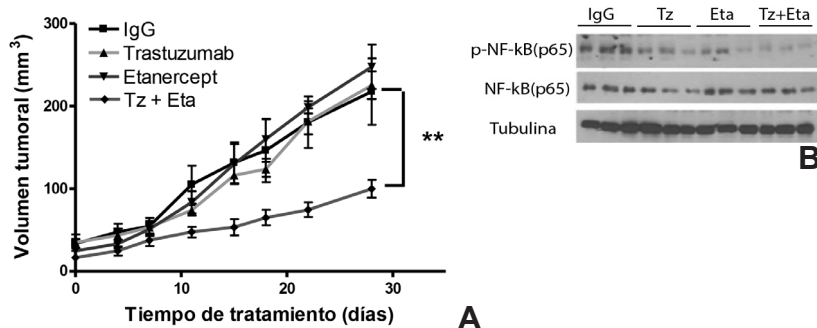


Figura 2 El tratamiento simultáneo con un anticuerpo anti-TNF α y trastuzumab bloquea el crecimiento de tumores resistentes de novo al trastuzumab. A. Los ratones *nude* fueron inyectados con 3×10^6 células JIMT-1 o KPL-4 y cuando el tumor alcanzó 50-70 mm³, se les administró 5 mg/kg de trastuzumab dos veces por semana, 5 mg/kg de etanercept una vez por semana o ambos anticuerpos simultáneamente. Como grupo control se utilizaron animales inyectados con 5 mg/kg IgG humana. Cada punto representa la media de volúmenes tumorales $\pm$ ES de 6-8 tumores. ** $p=0,03$ vs. IgG utilizando el test *t* no pareado de dos colas. **B.** Se realizaron Western blots de los extractos tumorales y se determinó la expresión de fosfo NF- κ B (p-NF- κ B) y de NF- κ B. Como control de carga se utilizó tubulina. Tz:trastuzumab, Eta: etanercept.

etanercept o IgG y luego realizamos un ensayo de unión de trastuzumab por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. La Figura 3 muestra que el tratamiento de las células JIMT-1 con etanercept aumentó significativamente la unión del trastuzumab. Estos resultados sugieren que el $\text{TNF}\alpha$, estaría provocando una perturbación en el acceso del trastuzumab a su epítipo.

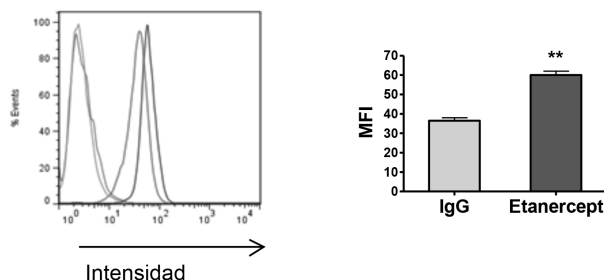


Figura 3 Unión de trastuzumab en células JIMT-1 cultivadas en presencia de etanercept. Las células JIMT-1 se cultivaron durante 48h en presencia de Etanercept 10 $\mu\text{g/ml}$ o IgG y luego se realizó una inmunofluorescencia indirecta utilizando como anticuerpo primario trastuzumab y luego una Ig anti humano conjugada con isotiocianato de fluoresceína. El panel derecho se muestra histogramas representativos y el izquierdo el promedio de intensidad de fluorescencia de las células. ** $P < 0,01$, test t Student.

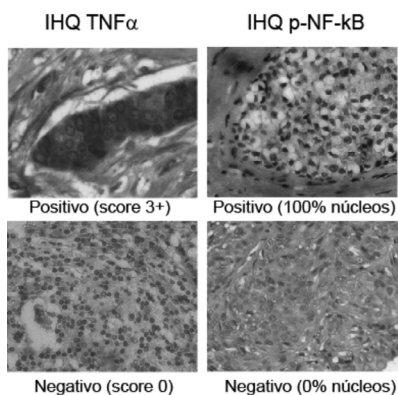
Expresión de $\text{TNF}\alpha$ y fosfo NF- κB en cáncer de mama invasivos

Para determinar si la expresión de $\text{TNF}\alpha$ y fosfo NF- κB tiene relevancia clínica, realizamos un estudio retrospectivo en una cohorte de 125 pacientes con cáncer de mama ductal invasivo. Las características clínico patológicas se correlacionaron con la expresión de ambos marcadores (Tabla 1). Se observó que la expresión de fosfo NF- κB se correlacionó positivamente con la expresión del receptor de estrógenos. Asimismo pudimos comprobar que existe una correlación positiva entre la expresión de $\text{TNF}\alpha$ y fosfo NF- κB (Tabla 2 y Figura 4). Por último evaluamos la expresión de $\text{TNF}\alpha$ y fosfo NF- κB de acuerdo a los subtipos de cáncer de mama. De esta forma observamos que la expresión de $\text{TNF}\alpha$ fue similar en los subtipos ErbB-2+, luminales (con expresión de receptores de estrógenos y progesterona pero ausencia de ErbB-2) y en los triple negativos (ausencia de expresión de receptores de estrógenos, progesterona y ErbB-2). En los cánceres de mama triple negativos hay una tendencia a una menor expresión de fosfo NF- κB , pero se deberá ampliar la cohorte para confirmarlo.

Tabla 1. Correlación entre la expresión de $\text{TNF}\alpha$ y fosfo NF- κB con las características clínico patológicas de la cohorte

Característica	$\text{TNF}\alpha$		P	p-NF- κB		P
	Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
Tamaño						
<2cm	17	55	0,970	18	54	0,165
≥ 2 cm	11	35		17	29	
Nódulos linfáticos						
Negativos	17	57	0,749	22	52	0,563
Positivos	11	32		15	28	
Grado histológico						
GH 1 y 2	6	31	0,217	12	25	0,877
GH 3	19	52		22	49	
Menopausia						
No	9	32	0,824	14	27	0,449
Si	19	61		22	58	
Receptores de estrógenos						
Negativos	3	11	0,585	8	6	0,016
Positivos	26	85		29	82	
Receptores de progesterona						
Negativos	6	20	0,986	10	16	0,266
Positivos	23	76		27	72	
ErbB-2						
Negativos	24	74	0,414	30	68	0,853
Positivos	4	17		6	15	

P: Se utilizaron los test de χ^2 o Fischer según corresponda.

**Figura 4.** Expresión de $\text{TNF}\alpha$ y fosfo NF- κB por IHC en tumores de mama invasivos. Se muestran tinciones representativas de tejidos positivos y negativos para cada marcador. Magnificación 400X**Tabla 2.** Correlación entre la expresión de $\text{TNF}\alpha$ y fosfo NF- κB

	$\text{TNF}\alpha$		P
	Negativo	Positivo	
NF- κB Negativo	14	23	0,011
Positivo	15	73	

Tabla 3. Expresión de TNF α y fosfo NF- κ B de los distintos subtipos de cáncer de mama

	Nº de pacientes	TNF α			p-NF- κ B	
		Negativo	Positivo	no documentado	Negativo	Positivo
Triple negativo	10	0 (0)	10 (100)	0	7 (70)	3 (30)
Luminal	94	22 (28)	59 (72)	13	25 (27)	69 (73)
ErbB-2 +	21	4 (19)	17 (81)	0	6 (29)	15 (71)
Total	125					

DISCUSIÓN

Las terapias basadas en la administración de trastuzumab son una poderosa opción terapéutica para los pacientes con cáncer de mama ErbB-2+. Debido a que una gran proporción de los tumores presentan resistencia al trastuzumab desde un comienzo, o luego de un tiempo de tratamiento, es necesario identificar a estos pacientes para ofrecerles otro tipo de terapias que resulten beneficiosas.

La activación aberrante de ciertas vías de señalización ha sido considerada responsable de la resistencia al trastuzumab. Así, la activación constitutiva del NF- κ B en muestras de cáncer de mama ErbB-2+ ha sido relacionada con la resistencia a terapias⁽¹²⁾. Al respecto, la transfección de células SK-BR-3 con una forma activada de p65NF- κ B les confirió resistencia *in vitro* al trastuzumab⁽¹³⁾. A pesar de los amplios conocimientos sobre la participación del NF- κ B en la progresión del cáncer de mama ErbB2+, éste es el primer estudio que demuestra que el TNF α , principal citoquina que activa a NF- κ B, puede modificar la sensibilidad al trastuzumab. Asimismo, nuestros resultados sugieren que el TNF α dificulta la unión del trastuzumab a su epítopo en la molécula del ErbB-2. Se ha reportado que uno de los mecanismos de resistencia al trastuzumab que tienen las células JIMT-1 es la expresión de mucina 4 (MUC4)⁽¹⁴⁾. La MUC4 es una glicoproteína de membrana que puede actuar como un impedimento estérico para la unión del trastuzumab. Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que el TNF α estaría favoreciendo la síntesis de MUC4.

Los estudios de expresión de fosfo NF- κ B y TNF α en muestras de cánceres de mama nos permitieron establecer una relación directa entre la expresión de ambos marcadores. Debido a la casuística limitada de tumores ErbB-2+ no se pudo establecer si estos marcadores tienen relevancia en la sobrevida de los paciente. Futuros estudios permitirán dilucidar el potencial

pronóstico de expresión de fosfo NF- κ B y TNF α en pacientes tratados con trastuzumab.

Nuestros resultados demuestran que el TNF α es un factor de resistencia *de novo* al trastuzumab y que la administración conjunta de un anticuerpo bloqueante anti TNF α junto con trastuzumab puede ser una alternativa terapéutica para evitar o superar los fenómenos de resistencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich, and W. L. McGuire. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182.
2. Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, and L. Norton. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N.Engl.J.Med.* 344:783-792.
3. Pierce, B. L., R. Ballard-Barbash, L. Bernstein, R. N. Baumgartner, M. L. Neuhouser, M. H. Wener, K. B. Baumgartner, F. D. Gilliland, B. E. Sorensen, A. McTier-nan, and C. M. Ulrich. 2009. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. *J.Clin.Oncol.* 27:3437-3444.
4. deGraffenried, L. A., B. Chandrasekar, W. E. Friedrichs, E. Donzis, J. Silva, M. Hidalgo, J. W. Freeman, and G. R. Weiss. 2004. NF-kappa B inhibition markedly enhances sensitivity of resistant breast cancer tumor cells to tamoxifen. *Ann. Oncol.* 15:885-890.
5. Rivas, M. A., M. Tkach, W. Beguelin, C. J. Proietti, C. Rosembliit, E. H. Charreau, P. V. Elizalde, and R. Schillaci. 2010. Transactivation of ErbB-2 induced by tumor necrosis factor alpha promotes NF-kappaB activation and breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res.Treat.* 122:111-124.
6. Tanner, M., A. I. Kapanen, T. Junttila, O. Raheem, S. Grenman, J. Elo, K. Elenius, and J. Isola. 2004. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol.Cancer Ther.* 3:1585-1592.
7. Kurebayashi, J., T. Otsuki, C. K. Tang, M. Kurosumi, S. Yamamoto, K. Tanaka, M. Mochizuki, H. Nakamura, and H. Sonoo. 1999. Isolation and characterization of a new human breast cancer cell line, KPL-4, expressing the Erb B family receptors and interleukin-6. *Br.J.Cancer* 79:707-717.
8. Rivas, M. A., R. P. Carnevale, C. J. Proietti, C. Rosembliit, W. Beguelin, M. Salatiño, E. H. Charreau, I. Frahm, S. Sapia, P. Brouckaert, P. V. Elizalde, and R. Schillaci. 2008. TNFalpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappaB-dependent pathways. *Exp.Cell Res.* 314:509-529.
9. Schillaci, R., P. Guzman, F. Cayrol, W. Beguelin, M. C. Diaz Flaqué, C. J. Proietti, V. Pineda, J. Palazzi, I. Frahm, E. H. Charreau, E. Maronna, J. C. Roa, and P. V.

- Elizalde. 2012. Clinical relevance of ErbB-2/HER2 nuclear expression in breast cancer. *BMC.Cancer* 12:74.
10. Workman, H. C., J. K. Miller, E. Q. Ingalla, R. P. Kaur, D. I. Yamamoto, L. A. Beckett, L. J. Young, R. D. Cardiff, A. D. Borowsky, K. L. Carraway, C. Sweeney, and K. L. Carraway, III. 2009. The membrane mucin MUC4 is elevated in breast tumor lymph node metastases relative to matched primary tumors and confers aggressive properties to breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 11:R70.
 11. Alldred, A. 2001. Etanercept in rheumatoid arthritis. *Expert.Opin.Pharmacother.* 2:1137-1148.
 12. Singh, S., Q. Shi, S. T. Bailey, M. J. Palczewski, A. B. Pardee, J. D. Iglehart, and D. K. Biswas. 2007. Nuclear factor-kappaB activation: a molecular therapeutic target for estrogen receptor-negative and epidermal growth factor receptor family receptor-positive human breast cancer. *Mol.Cancer Ther.* 6:1973-1982.
 13. Bailey, S. T., P. L. Miron, Y. J. Choi, B. Kochupurakkal, G. Maulik, S. J. Rodig, R. Tian, K. M. Foley, T. Bowman, A. Miron, M. Brown, J. D. Iglehart, and D. K. Biswas. 2014. NF-kappaB activation-induced anti-apoptosis renders HER2-positive cells drug resistant and accelerates tumor growth. *Mol.Cancer Res.* 12:408-420.
 14. Nagy, P., E. Friedlander, M. Tanner, A. I. Kapanen, K. L. Carraway, J. Isola, and T. M. Jovin. 2005. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res.* 65:473-482.

ABSTRACT

ErbB-2 (HER2/neu) amplification occurs in ~20% of invasive breast cancers and its association with poor prognosis is firmly established. Trastuzumab, the first clinically approved monoclonal antibody against ErbB-2, has changed therapeutic options of ErbB-2 -positive breast cancer patients. However, the overall response rate to trastuzumab is about 40-60% when used in combination with chemotherapy. Response failure is due principally to de novo resistance. In this work, we find that $\text{TNF}\alpha$ plays a central role limiting trastuzumab effectiveness. Treatment with etanercept, a $\text{TNF}\alpha$ -blocking antibody, sensitizes JIMT-1 cells, a de novo trastuzumab-resistant breast cancer model, to trastuzumab treatment, inhibiting cell proliferation and reducing tumor burden. We also determined that the activation of the transcription factor NF- κ B was dramatically inhibited in tumors from mice receiving etanercept and trastuzumab compared to trastuzumab, etanercept and IgG-treated animals. In order to find out a mechanism of $\text{TNF}\alpha$ -induced trastuzumab resistance we investigated whether this cytokine can modulate trastuzumab binding. We observed that blockade of $\text{TNF}\alpha$ with etanercept increased trastuzumab binding in JIMT-1 cells. To address the role of $\text{TNF}\alpha$ and the acti-

vated form of NF- κ B, phospho NF- κ B, in the clinical scenario, we examined their expression by immunohistochemistry in a patient cohort of 125 primary invasive breast cancers. We observed a positive correlation between TNF α and phospho NF- κ B expression and between phospho NF- κ B and estrogen expression. Our findings uncover TNF α as an important hindrance to trastuzumab effectiveness and suggest that targeting TNF α along with trastuzumab administration appears as a feasible combined therapeutic strategy able to overcome trastuzumab resistance.

EXPOSICIÓN A NIVELES ELEVADOS DE ARSÉNICO EN EL AGUA DE BEBIDA Y SU IMPACTO SOBRE LA SALUD EN UNA POBLACIÓN DE LA PROVINCIA DE TUCUMÁN

Dra. Analía Graciela Soria de González, Dra. Liliana Mónica Tefaha, Bioq. Esp. Rosa Silvina Guber, Dra. Roxana Toledo, Dra. Adriana Liatto de Nogalo, Ing. Mg. Sergio E. Roshdestwesnky, Bioq. Esp. Sonia Pilar. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional del Nordeste.

INTRODUCCIÓN:

El consumo prolongado de agua con contenido de As mayor a 0.05 mg/L, puede dar lugar al Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE), siendo un problema socio sanitario de alta importancia en comunidades deprimidas de Tucumán. El arsénico (As) ingresa con agua que contiene altas concentraciones del metaloide, generando que las poblaciones sean afectadas a medida que se acumula en el organismo. Respecto de su letalidad potencial, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, clasifica al As como carcinógeno del grupo A y el Centro de Investigaciones sobre Cáncer lo incluye en el grupo I, indicando ambos casos que es carcinógeno en seres humanos. Se caracteriza por trastornos cutáneos progresivos que pueden coexistir con lesiones extracutáneas. La asociación del consumo de agua con As y cáncer de piel, carcinoma de vía urinaria, hígado, pulmón y próstata ha sido bien documentada. El Cáncer de Próstata es el cáncer más comúnmente diagnosticado en el sexo masculino y después del de Pulmón, es la segunda causa de muerte por cáncer. Su incidencia y mortalidad continúan en aumento, conformando un importante problema de salud pública, en estrecha relación con el aumento de la longevidad poblacional. También fue documentada la hepatotoxicidad inducida por As que se manifiesta frecuentemente como hepatomegalia, siendo sus formas clínicas: esclerosis hepatoportal con o sin cirrosis, carcinoma hepatocelular y angiosarcoma. Varios estudios epidemiológicos sugieren que la exposición crónica al As incrementa el riesgo de diabetes y enfermedades cardiovasculares como hipertensión arterial, enfermedad cardíaca isquémica y aterosclerosis carotídea. Los objetivos de este Proyecto fueron identificar en el Departamento Graneros

de la provincia de Tucumán pobladores que consumen agua de bebida con niveles mayores a 0,05mg/L de As, correlacionando los niveles determinados en el agua con la concentración de As en orina. Asimismo se plantea determinar el impacto sobre la salud en la población expuesta a través de presencia de signos dermatológicos, manifestaciones clínicas y bioquímicas hepáticas, prevalencia de diabetes e hipertensión arterial y en hombres mayores de 50 años si tienen aumentado el riesgo de padecer cáncer de próstata.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Estudio analítico comparativo con grupo control de corte transversal, período 2012–2014, muestreo consecutivo. Se realizaron visitas al departamento de Graneros. Se estudiaron habitantes que fueron identificados como consumidores crónicos de agua de pozo con niveles mayores a 0,05 mg/L de As a los cuales se los calificó como grupo expuesto (GE). Se realizaron los mismos estudios en pacientes que tomaban agua de red, libre de As, a los cuales se clasificó como grupo no expuesto (GNE). A cada uno de los pobladores visitados se les explicó la naturaleza del trabajo, la voluntariedad del acto, su derecho a no participar y se les garantizó el anonimato. Se les dio instrucciones escritas y verbales de como recoger el agua de consumo y la orina en la población identificada como GE, explicándoles que debían concurrir en ayunas y se les dejó una invitación para el día de visita al Centro de Atención Primaria de la Salud. Se determinó As en agua de pozo domiciliario, por método de cuantitativo de Gutzey y el Arsénico Urinario por Espectrofotometría de Absorción Atómica en las muestras de orina. Concurrieron en total 116 personas de los cuales 55 pertenecían al GE y 61 al GNE, se excluyeron seis personas del GE y tres del GNE por presentar trastornos urinarios al momento de la consulta. El GE quedó constituido por 49 personas, 20 Varones y 29 Mujeres y el GNE por 58, 38 Varones y 20 Mujeres. Se les realizó historia clínica indagando los datos demográficos, socios económicos y personales como la altura, peso, el Índice de Masa Corporal (IMC) que se calculó dividiendo el peso por la altura al cuadrado expresando los resultados en Kg/m². Se consideró un IMC menor a 25 como normal, de 25 a 30 con sobrepeso y más de 30 Kg/m² como obeso, presión arterial, historia de permanencia en el lugar, consumo de tabaco y alcohol, o de otras drogas (medicamentos, hierbas naturales etc.), historia familiar de cáncer, enfermedades previas, el tiempo de exposición al arsénico. Se examinaron las manifestaciones cutá-

neas consignándose: hiperhidrosis, hiperqueratosis palmoplantar, hiperpigmentación difusa o leucomelanodermia, lesiones preneoplásicas cutáneas (leucoplasia, queratosis actínica, cicatrices crónicas, úlceras crónicas etc.) y lesiones compatibles con cáncer cutáneo epidermoide o basocelular. A todas las personas se les tomó una muestra de sangre venosa para las determinaciones de alaminotransferasa (ALAT) y la aspartataminotransferasa (ASAT), fosfatasa alcalina (FAL), colesterol (COL) y glucosa (GLU) dosado con métodos colorimétricos (Wiener Lab) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. A todos los varones mayores de 50 años se les realizó la determinación sérica del Antígeno Prostático Específico Total (APET) por un análisis cuantitativo automatizado con el equipo COBAS e 411 de Laboratorio Roche. Se tomaron como valores de referencia para GGT 8 a 38 U/L, FAL 68 a 240 UI/L, ALT y AST hasta 12 U/L, COL hasta 200 mg/dl, GLU 70 a 110 mg/dl, APET hasta 4 ng/ml APEL hasta 0,36 ng/ml, As en agua hasta 0,05 mg/L y AsU hasta 12 ug/L. Se realizó un análisis descriptivo de las variables. El contraste de normalidad se realizó con el test de Kolmogorov-Smirnov. La comparación de las variables entre grupos se realizó mediante el test t-Student. Se utilizó la prueba de Chi Cuadrado y se estimaron los odds ratios (OR) y el Intervalo de Confianza 95% (IC 95%) mediante el programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS 20.0) para Windows. Se estableció una asociación estadísticamente significativa cuando se halló un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS:

Asociación entre As en Agua y As Urinario:

Cuando se analizó los niveles de As en Agua y As en orina de los pacientes del GE según el sexo se determinó que el Nivel medio + DS de As en agua fue de $0,13 \pm 0,11$ mg/L y $0,21 \pm 0,29$ mg/L para mujeres y varones respectivamente. Las diferencias no fueron significativas. La concentración de As en orina fue de $11,2 \pm 9,7$ ug/L y $31,8 \pm 28,4$ ug/L para mujeres y varones respectivamente. Las diferencias fueron significativamente mayor en Varones que en Mujeres ($p < 0,001$). No se encontró asociación entre los niveles de As en agua y la concentración de As determinada en orina.

Lesiones Dermatológicas:

Se encontraron 11 lesiones dermatológicas compatibles con hidroarsenicismo en el GE (22,4%), ocho casos correspondían al sexo masculino y tres

a mujeres. En los varones se caracterizaron las siguientes lesiones dérmicas; cuatro hiperhidrosis, una asociada a hiperqueratosis e hiperpigmentación, una hiperqueratosis con hiperpigmentación, una enfermedad de Bowen y un carcinoma espinocelular. En las mujeres, una hiperhidrosis, una asociada a hiperqueratosis e hiperpigmentación y una hiperqueratosis e hiperpigmentación. La distribución de las lesiones dermatológicas más frecuente fueron palmo-plantar. Los niveles de As en el agua de bebida y el tiempo de exposición no fueron significativamente diferentes entre los pacientes que presentaron y los que no evidenciaron lesiones dermatológicas.

Manifestaciones clínicas hepáticas:

No hubo diferencias significativas en la presencia de hepatomegalia entre el GE y GNE. Los niveles GGT, AST, ALT, FAL y COL fueron de 20,4+6,8 U/L, 10,4+3,4 U/L, 8,7+2,1 U/L 170,7+52,5 UI/L y 210,6+47,6 mg/dl para el GE y 22,5+8,2 U/L, 9,4+4,3 U/L, 8,8+3,2 U/L, 164,9+57,5 UI/L y 205,0+33,8 mg/dl para el GNE respectivamente, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas.

Asociación entre exposición al Arsénico e Hipertensión Arterial (HTA):

Se consideró hipertenso, al diagnóstico previo de HTA o Presión Arterial ≥ 140 de sistólica y/o 90 mmHg de diastólica (en tres tomas).

La prevalencia de hipertensión fue de 56,3% (IC del 95%: 44,8-67,8) en el GE y 70,1% (IC del 95%: 63,3-76,9) en el GNE. No se encontró asociación entre HTA y exposición al Arsénico. En el GE se encontró un 7,9%, 60,5% y 31,6% de hipertensos en menores de 40, 40-60 y mayores de 60 años respectivamente. Se encontró asociación entre HTA y edad de los pacientes Chi cuadrado de Pearson $r = 11,26$ $p < 0,004$. No se encontró asociación entre HTA y concentración de As en agua. El 20,6% de pacientes tenían peso normal, 44,1% tenían sobrepeso y 35,3% eran obesos. Se encontró asociación entre HTA e IMC: Chi cuadrado de Pearson $r = 10,70$ $p < 0,005$.

Asociación de exposición al Arsénico y Diabetes:

La prevalencia de Diabetes en el GE fue del 17% y en el GNE del 26%. No se encontró asociación entre Diabetes y exposición a niveles elevados de Arsénico en el agua de bebida. Estas cifras son superiores a las comunicadas por la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2009, que comunican una prevalencia del 9,6%.

Asociación de exposición al Arsénico y Cáncer de próstata

Se diagnosticó un paciente con cáncer de próstata que pertenecía al GNE. No se pudo establecer una relación entre este carcinógeno y presencia de Cáncer de Próstata.

CONCLUSIONES

- La mayor concentración de As en orina encontrada en varones coincide con lo encontrado en la literatura y podría deberse a mayor consumo de agua y/o niveles de As mayores o mayor capacidad para la eliminación.
- Con respecto a las lesiones dermatológicas, los varones presentaron lesiones dermatológicas con mayor frecuencia las cuales pueden ser potenciadas por la radiación solar a la que se encuentran expuestos por su actividad laboral, lo cual resultaría en un efecto sinérgico para el desarrollo de cáncer de piel. La no asociación entre niveles y tiempo de consumo de As y lesiones dermatológicas sugerirían la existencia de una susceptibilidad individual.
- A diferencia de lo documentado por otros autores, no se encontró diferencias significativas entre la presencia de hepatomegalia en el GE y GNE. Los niveles de enzimas hepáticas en ambos grupos fueron similares, lo que podría deberse a las diferencias nutricionales, sociales y económicas de las poblaciones estudiadas, y en las diferencias en las dosis y el tiempo.
- No se encontró asociación entre exposición al consumo de As en agua de bebida y prevalencia de HTA. Con respecto a los Factores de Riesgo los resultados coinciden con estudios nacionales e internacionales encontrándose una mayor prevalencia a medida que aumenta la edad y el IMC.
- Si bien no se encontró una asociación entre exposición al As en agua de bebida y Diabetes, la prevalencia en los pacientes estudiados fue casi el doble a lo publicado a nivel nacional por lo que se sugiere realizar estudios que incluyan un mayor número de pacientes para extraer conclusiones que permitan establecer la situación real con respecto a esta patología e implementar medidas preventivas.
- No se encontró un mayor riesgo de padecer Cáncer de Próstata en la población Expuesta a niveles elevados de As en el agua de bebida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anetor, JI; Wanibuchi, H; Fukushima, S. 2007. Arsenic exposure and its health effects and risk of cancer in developing countries: micronutrients as host defense. *Asian Pac J Cancer Prev*, 8: 13-23.
2. Guber, RS.; Tefaha, L.; Soria, A.; et al. 2009. Levels of arsenic in the drinking water in Leales and Graneros (Tucuman-Argentina). *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 43: 201-207.
3. Guha, M. 2008. Chronic arsenic toxicity & human health. *Indian J Med Res*. 128: 436-447.
4. Islam, K.; Haque, A.; Karim, R.; et al. 2011. Dose-response relationship between arsenic exposure and the serum enzymes for liver function tests in the individuals exposed to arsenic: a cross sectional study in Bangladesh. *Environ Health*, 10: 64-75.
5. Marchiset-Ferlay, N.; Savanovitch, C.; Sauvart-Rochat, MP. 2012. What is the best biomarker to assess arsenic exposure via drinking water?. *Environ Int*. 39: 150-171.
6. Sengupta, SR.; Das, NK.; Datta PK. 2008. Pathogenesis, clinical features and pathology of chronic arsenicosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 74: 559-570.
7. Soria, A.; Guber, RS.; Martínez, M.; et al. 2009. Biochemical alterations in individuals consuming high levels of arsenic in drinking water in Tucuman, Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 43: 611-618.
8. Soria, A.; Tefaha, L.; Guber, RS.; et al. 2011. Total prostatic specific antigen levels among subjects exposed and not exposed to arsenic in drinking water. *Rev. Med. Chile*, 139: 1592-1598.

ABSTRACT

The aim of this work was to register exposed populations to the As in drinking water and determine the association with clinical and biochemical alterations described in the HACRE in rural population of Tucuman province (Argentina). Residents of Graneros department were invited to take part. Demographic, socio-economic and personal data were recollected. In clinical history, cutaneous manifestations, pathologies like diabetes, and arterial hypertension were considered. Concentration of arsenic was determined in drinking water and urine. Complementary biochemical assays were analyzed. 116 rural adults' inhabitants settle in the region for more than 5 years in the area of study. The exposed population (EG) involved 49 volunteers and the no exposed group (NEG) 58 individuals. The results were analyzed by SPSS software and $p < 0.05$ was considered significant. The average concentration of As in the drinking water consumed by the EG was $0,13 \pm 0,11$ mg/L y

0,21±0,29 mg/L for males and females respectively. The average concentration of As in urine was 11,2±9,7 ug/L y 31,8±28,4 ug/L for males and females respectively and was significant higher in males. There were 11 cases with dermatological lesions. Male subjects usually had higher proportions of skin lesions when compared with female subjects. The serum hepatic enzyme activities no were found to be significantly increased in the EG compared to the NEG. It not can be found the positive association in the EG with hypertension, diabetes or prostate cancer. In conclusion, our study suggests that residents in Graneros study area are currently at risk of arsenic. The present study demonstrated that males were more likely to be diagnosed with skin sign of arsenicosis than females. No association was found between higher drinking water arsenic and hypertension, serum hepatic enzyme activity and diabetes. More commitment should be made to address this public health concern in rural Tucumán.

PREDICTORES DE PÉRDIDA SIGNIFICATIVA DE MASA Y FUERZA MUSCULAR EN ADULTOS MAYORES INTERNADOS EN EL HOSPITAL ALEMÁN.

Vázquez Graciela Mónica, Manzotti Matias Edgardo, Perret María Clara,
Alessandrini Graciana, Lemos Sofía, Catalano Hugo Norberto
Unidad de Geriatria. Servicio de Clínica Médica. Departamento de Medicina.
Hospital Alemán. Buenos Aires

INTRODUCCION

La sarcopenia es un síndrome caracterizado por una pérdida gradual y generalizada de la masa muscular esquelética y de la fuerza, y que implica un alto riesgo de presentar resultados adversos como discapacidad física, calidad de vida deficiente y aumento de mortalidad^{1,2}.

La misma incrementa el riesgo de caídas y fracturas y aumenta la dependencia funcional y discapacidad en el anciano.³ El EWGSOP recomienda utilizar la presencia de una masa muscular baja y una función muscular deficiente (fuerza o rendimiento) para diagnosticar la sarcopenia. Más del 50% de los pacientes hospitalizados por más de 12 días presentan disminución de la masa muscular magra⁴. La síntesis de proteína muscular diaria durante 10 días de inactividad en adultos mayores disminuye un 30%⁵. Una fuerza muscular baja se asocia con una mayor probabilidad de muerte prematura, desarrollo de la discapacidad, y un mayor riesgo de complicaciones o internación prolongada después de la hospitalización o cirugía⁶. Por ello desarrollamos este estudio con el fin de identificar los factores de riesgo asociados a la aparición de sarcopenia y dinapenia durante la internación de paciente en una UGA (Unidad Geriátrica de Agudos) para así poder planificar estrategias de prevención

MATERIALES Y METODOS

Se registraron los datos de los adulto mayores internados en la unidad geriátrica de agudos (UGA) del Hospital Alemán, entre noviembre del 2012 a octubre del 2014. Con un seguimiento hasta fines de abril del 2015.

Se incluyeron pacientes autoválidos mayores de 65 años internados en la UGA.

Se excluyeron aquellos pacientes incapaces de cumplir órdenes, que tuvieran estadía hospitalaria menor a 72 hs, o el ingreso a la UGA con 72hs o más de estadía hospitalaria, pacientes en estado terminal, con edema o linfedema en MMII, con síndrome confusional, o en aislamiento.

Definición operacional de las variables y categorías:

- a) Fuerza y masa muscular: Se evaluó la masa muscular por medio de la circunferencia de la pantorrilla medida con cinta métrica de metal en la parte media de la pantorrilla, la cual se marcó con material indeleble para mediciones posteriores. Se consideraron como valores de corte marcadores de sarcopenia, los menores a 31 cm.

Se mensuró la fuerza muscular a través de la fuerza de agarre de la mano (hand grip) medida con un dinamómetro marca BASELINE. Se realizó utilizando la mano dominante y registrando la mayor de tres mediciones. Se consideraron como valores de corte marcadores de sarcopenia, los menores 30 kg en el hombre y menores a 20 kg en la mujer.

El EWGSOP (Grupo Europeo de Trabajo sobre la Sarcopenia en Personas de Edad Avanzada) recomienda utilizar la presencia de una masa muscular baja y una función muscular deficiente (fuerza o rendimiento) para diagnosticar la sarcopenia.

Dinapenia: denominamos dinapenia a la fuerza muscular con valores menores 30 kg en el hombre y menores a 20 kg en la mujer con diámetro de pantorrilla mayor o igual a 31cm.

- b) Variables demográficas: Género y edad.

- c) Variables Funcionales:

Las actividades básicas de la vida diaria era valoradas a través del Índice de Katz modificado (ABVD). Consideramos dependiente a aquel que tenga dependencia en dos o más actividades básicas de la vida diaria.

Las actividades instrumentales de la vida diaria valoradas eran a través de la Escala de Lawton y Brody (AIVD). Consideramos dependiente a aquel que tenga dependencia en dos o más actividades instrumentales de la vida diaria

- d) Cognición valorada a través del Mini Mental Test (MMSE)

- e) Presencia de comorbilidades severas, grado 3 o 4 valoradas según la Escala Acumulativa de Comorbilidades Geriátricas (CIRS-G)
- f) Comorbilidades relacionadas con sarcopenia:
- g) Riesgo nutricional NSI (Nutritional Screening Initiative): 0-2 = Bueno; Mayor a 2= Riesgo nutricional
- h) Motivo de ingreso: patología clínica, patología quirúrgica
- i) Proveniencia del paciente a su ingreso (Domicilio, Centro de rehabilitación, Geriátrico, Unidad cerrada).
- j) Fármacos relacionados con sarcopenia
- k) Valores de Albúmina sérica (consideramos desnutrición a valores por debajo de 3.5 mg/dl), Vitamina D al ingreso (consideramos valor normal mayor a 30 ng/ml)

Al ingreso se evaluó fuerza y masa muscular, variables extraídas de la VGI, parámetros de laboratorio.

Durante la internación se evaluó la incorporación de suplemento dietario, rehabilitación motora.

Al egreso se evaluaron fuerza y masa muscular e institucionalización.

A los seis meses se evaluaron fracturas, reinternación y mortalidad

RESULTADOS

Se evaluaron 109 pacientes (p). El 68% (CI95% 59-76) (p74), fueron mujeres. La edad promedio era de 78.

El 50% (CI95% 41-60) (p55) de las internaciones correspondieron a patologías clínicas.

El 100%, (CI95% 97-100), de la población procedía de su domicilio. El 83% (CI95% 74-89) (p90), era independiente en las AIVD.

El MMSE promedio era de 28, (DS± 3). El 69% (CI95% 60-77) (p75), presentaban comorbilidades severas, el 46% (CI95% 37-55) (p 50), presentaba riesgo nutricional.

El 51% (CI95% 42-61) (p56), presentaba alguna comorbilidad relacionada con sarcopenia, el 61% (CI95% 52-70) (p67), tenía algún fármaco relacionado con sarcopenia.

La albúmina promedio al ingreso era 3,6g/dl (DS± 0,6). El valor promedio de vitamina D era de 18ng/ml (DS 8).

La media de internación fue 8,2 días, (DS±9).

Durante la internación perdieron fuerza muscular el 51% (CI95% 42-61) (p56) de la población. El 92% (CI95% 67-99) (p12/13), de los pacientes que tuvieron más de diez días de internación perdieron fuerza muscular. En los pacientes con más de diez días de internación la diferencia de media fue de 7 kg (CI95% 3.87 - 9.36).

Durante la internación perdieron masa muscular el 10% (CI95% 0.06-21) (p11) de la población. El 31% (CI95% 13-56) (p4/13), de los pacientes que tuvieron más de diez días de internación perdieron masa muscular.

La prevalencia de sarcopenia en la población estudiada fue del 13% (p14). La prevalencia en mujeres fue del 15%⁽¹¹⁾, la prevalencia en mujeres mayores de 80 años fue del 23% (p8). La prevalencia en hombres en la población estudiada fue del 8,6% (p3); la prevalencia en hombres mayores de 80 años fue 67% (p2). La incidencia de sarcopenia en la población estudiada fue del 4.6% (p5).

La prevalencia de dinapenia en la población estudiada fue de 59,6% (p65). La incidencia de dinapenia en la población estudiada fue de 12.8% (p14).

El 93% (CI95% 86-96) (p101), retornó a su domicilio. El 6% (CI95% 3-13) (p7) se derivó a un centro de rehabilitación. El 1% (CI95% 0.1-5) (p1) se institucionalizó en un geriátrico.

A los seis meses la tasa de reinternación fue del 33% (CI95% 25-42) (p36), y la mortalidad fue del 5% (CI95% 2-10) (p5).

En el análisis bivariado la asociación entre días de internación y dinapenia durante la internación fue significativa (RR 3 (CI95% 1.1-8,5 p0.04).

En el análisis bivariado la asociación entre días de internación y sarcopenia durante la internación fue significativa (RR 6 (CI95% 2.5-15,8 p0.0007), como también, lo fue la asociación entre pacientes que se internaron por patologías clínicas y sarcopenia durante la internación (RR 2 (CI95% 1.7-2,5 p0.02).

En el análisis multivariado la asociación entre días de internación y sarcopenia durante la internación fue significativa (p 0.003), como también, lo fue la asociación entre pacientes que se internaron por patologías clínicas y sarcopenia durante la internación (p0.03).

En el análisis multivariado la asociación entre mortalidad y dinapenia durante la internación fue significativa ($p\ 0.02$), como también, lo fue la asociación entre reinternaciones y dinapenia durante la internación ($p0.04$).

No encontrándose diferencias significativas entre el resto de las asociaciones.

DISCUSIÓN

La mayoría de los pacientes que ingresan a la UGA son dependientes en las actividades básicas de la vida diaria, esto explica la baja tasa de reclutamiento de pacientes para el presente trabajo.

La prevalencia de sarcopenia varía de acuerdo a la técnica utilizada para medir la masa muscular, la población de referencia y definición utilizada. En concordancia con los estudios de Baumgartner⁷ y con el estudio IN CHIAN-TI⁸ observamos que la prevalencia aumenta con la edad y que la prevalencia en menores de 80 años es mayor en mujeres, mientras que en los mayores de 80 años es mayor en hombres.

Los datos del estudio de Kortebein et al sugiere que la pérdida de masa magra muscular tras el reposo en ancianos supera a la pérdida experimentada en los jóvenes.⁹ En nuestro estudio el 10% de la población perdió masa muscular con una diferencia de media de 0.04 cm. El 31% de los pacientes que estuvieron diez o más días de internación perdió masa muscular.

En el adulto mayor diez días de reposo en cama produce un decremento del 11-12% por semana de la fuerza de máxima torsión isocinética de los músculos extensores de la rodilla.¹⁰ En nuestro estudio el 92% de la población que estuvo internada más de 10 días perdió fuerza muscular durante la internación con una diferencia de media de 7 kg.

Hallamos una asociación significativa entre sarcopenia y días de internación.

En varias cohortes y en una revisión sistemática se observó asociación entre fuerza de prehensión baja y mortalidad prematura, discapacidad, estadía hospitalaria prolongada y complicaciones.¹¹⁻¹⁴ En nuestro estudio observamos una asociación significativa con mortalidad y reinternaciones.

En una serie de estudios se evidenció que la ingesta diaria de proteínas de alta calidad biológica entre 1 a 1,2 gr por kilo de peso/día limitaría la pérdida de masa muscular. Los ejercicios de resistencia potencian el anabolismo

proteico. La actividad física aunque sea poco intensa y de corta duración resulta beneficiosa. En situaciones en el que los ejercicios de resistencia no pudieran realizarse, la estimulación eléctrica neuromuscular es una alternativa viable.¹⁵⁻¹⁶ En el metaanálisis realizado por Peterson et al se demostró que los ejercicios de resistencia son eficaces para mejorar la fuerza en los adultos mayores.¹⁷ Todos los pacientes que ingresan a la UGA se les indican rehabilitación motora a su ingreso y la nutrición está a cargo de nutricionistas que confeccionan la dieta acorde a las comorbilidades y preferencias del paciente. Posiblemente nos deberíamos asegurar que reciban una dieta rica en proteínas y que rehabilitación incluya ejercicios de resistencia o en su defecto estimulación eléctrica neuromuscular.

CONCLUSIONES

Cómo geriatras nuestro objetivo es evitar la dependencia y retrasar los años de morbilidad en los pacientes ancianos por ello el presente estudio nos permite objetivar la pérdida de fuerza y masa muscular permitiéndonos elaborar futuras estrategias.

Agradecimiento: A la Fundación Alberto J. Roemmers por el subsidio otorgado que nos permitió realizar este trabajo

BIBLIOGRAFIA

1. Cruz-Jentoft AJ et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis / Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age and Ageing* 2010; 39: 412–23.
2. Fielding et al. Sarcopenia: An Undiagnosed Condition in Older Adults. Current Consensus Definition: Prevalence, Etiology, and Consequences. International Working Group on Sarcopenia. *JAMDA* 2011; 12: 249-256.
3. Burgos Peláez R. Sarcopenia en ancianos. *Endocrinol Nutr.* 2006; 53:335-44
4. Pichard C et al. Nutritional assessment: lean body mass depletion at hospital admission is associated with an increased length of stay. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79:613-8.
5. Alley DE et al. Health, Aging and Body Composition Study. Hospitalization and change in body composition and strength in a population-based cohort of older persons. *J Am Geriatr Soc.* 2010; 58:2085-91.

6. Richard W. Bohannon. Hand-Grip Dynamometry Predicts Future Outcomes in Aging Adults. *Journal of Geriatric Physical Therapy* 2008; 31:3-10.
7. Baumgartner RN, et al. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol.* 1998; 147:755–63.
8. Hicks, GE et al Absolut estrength and loss of strength as predictors of mobility-decline in olders adults: the In CHIANTI Study. *JgerontolA Biol Sci Med Sci* 2012; 67: 66-73.
9. Kortebein P, et al. Effect of 10 days of bed rest on skeletal muscle in healthy older adults. *Jama.* 2007; 297:1772–1774
10. English KL, Paddon-Jones D. Protecting muscle mass and function in older adults during bed rest. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 2010; 13:34-39.
11. Richard W. Bohannon, PT, EdD. Hand-Grip Dynamometry Predicts Future Outcomes in Aging Adults. *J Geriatr Phys Ther.* 2008;31:3-10.
12. Anne B. Newman, Varant Kupelian, et al. Strength, But Not Muscle Mass, Is Associated With Mortality in the Health, Aging and Body Composition Study Cohort. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61: 72-77
13. Sasaki H1, Kasagi F, Yamada M, Fujita S. Grip strength predicts cause-specific mortality in middle-aged and elderly persons. *Am J Med.* 2007; 120:337-42.
14. Catharine R Gale, et al. Grip strength, body composition, and mortality. *Int. J. Epidemiol.* 2007; 36: 228-235
15. Cuthbertson D, et al. Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *Faseb J.* 2005; 19:422–424.
16. Katsanos CS, et al. Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82:1065–1073.
17. Peterson MD, et al. Resistance Exercise for Muscular Strength in Older Adults: A Meta-Analysis. *Ageing research reviews.* 2010; 9:226-237.

ABSTRACT

Background: Sarcopenia is a syndrome characterized by a gradual and widespread loss of skeletal muscle mass and strength, which implies a high risk of adverse outcomes such as physical disability, poor quality of life and increased mortality. The objective of the study was to determine the risk factors associated with the onset of sarcopenia and dynapenia during hospitalization in an acute geriatric unit (AGU).

Methods: We recorded data on older adults hospitalized in acute geriatric unit at Deutch Hospital in Buenos Aires from November 2012 to October 2014. Patients independent in Basic Activities of Daily Living over 65 were included. Muscle strength (handgrip) and muscle mass (calf circumference) were recorded at admission and at the moment of discharge. Occurrence of

fractures, mortality and readmission was recorded until 6 months after discharge.

Results: We included 109 patients (mean age 78); 68% were women, 51% lost muscle strength and 10% lost muscle mass. Readmission rate at 6 months was 33% and mortality was 5%. The prevalence of sarcopenia was 13%. The prevalence of dynapenia was 59,6%. When performing a multivariate analysis we found significant association between developing sarcopenia and length of stay (p 0.003), and between being hospitalized for clinical diseases and developing sarcopenia (p 0.03). There was significant association between mortality and dynapenia (p 0.02), and between readmissions and dynapenia (p 0.04).

Conclusion: Our study evidenced that hospitalization is associated with developing sarcopenia and dynapenia and that the latter is independently associated with mortality, readmissions and dependency.

DETECCIÓN DE PAPILOMAVIRUS HUMANO (VPH) EN LESIONES DE LA CAVIDAD ORAL: COMPARACIÓN CON OTROS FACTORES DE RIESGO

Raúl Fernando Venezuela, Ángel Talavera, María Celia Frutos, Ana Ximena Kiguen¹, Marina Soledad Monetti, María Sollazo, René Panico, Ramiro Tomasi, Ruth Ferreyra de Prato, Cecilia Gabriela Cuffini¹

Instituto de Virología Dr J.M.Vanella – FCM - UNC

INTRODUCCION:

El cáncer de la cavidad oral es un problema de salud importante en todo el mundo, que suele aparecer en pacientes mayores de 50 años de edad; sin embargo, algunos estudios han demostrado que entre el 1 al 6 por ciento de los tumores malignos orales se han encontrado en pacientes menores de 40^(1,2,3). La mayoría de estos tumores malignos son carcinomas orales de células escamosas (COCE) y se caracterizan por una etiopatogenia multifactorial^(4,5). La asociación causal entre el consumo de tabaco y el consumo de alcohol con el desarrollo de COCE está bien establecida; sin embargo, una proporción considerable de COCE se produce en los no fumadores y no bebedores, lo que indica la presencia de otros factores de riesgo^(5,6,7). Durante las últimas décadas, los datos epidemiológicos y moleculares han indicado la participación del virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) en estas enfermedades, que fue propuesta por primera vez por Syrjanen en 1983 y después, con el apoyo de otros autores^(5,8,9,10) sobre la base de la naturaleza epiteliotrópica de VPH^(11,12), el potencial oncogénico de VPH-AR, ampliamente confirmado en la patogénesis del cáncer de cuello de útero^(13,14) y las similitudes morfológicas entre los epitelios orofaríngeos y genital⁽¹⁵⁾. Aunque el VPH se ha encontrado en COCE, la amplia gama de prevalencia del virus reportados en la literatura no ha contribuido a aclarar la relación entre el VPH y la carcinogénesis oral,^(16,17).

El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de detección de VPH y genotipos que circulan en lesiones de la cavidad oral, así como su correlación con otros factores de riesgo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes: Este estudio se realizó en pacientes diagnosticados y tratados en la Facultad de Odontología - Universidad Nacional de Córdoba. Todos se sometieron a un análisis de sus historias clínicas y firmaron un consentimiento informado.

Los pacientes presentaron diagnóstico histopatológico de lesiones benignas (lesiones vegetativas, verrugas y condilomatosis), lesiones potencialmente malignas (leucoplasia, liquen, leucoplasia verrugosa, queratoacantoma)⁽¹⁸⁾ y neoplasias (carcinoma verrugoso, carcinoma in situ y COCE). Los casos control fueron individuos inmunocompetentes con mucosa oral sana.

Los datos se clasificaron según el género, edad, factores de riesgo convencionales (fumar tabaco y beber alcohol), localización de la lesión, diagnóstico histopatológico y clasificación citológica de las lesiones.

La consideración de un individuo como un fumador y / o bebedor se basaba en el estudio de Herrero 2003⁽¹⁹⁾.

La población de estudio se compuso de 84 pacientes (9 con lesiones benignas, 29 lesiones potencialmente malignas, 16 neoplasias y 30 sujetos de control).

Obtención de la muestra: los participantes fueron sometidos a una examen oral para la recolección de las células por cepillado para la detección del ADN-VPH. Los pacientes con presencia de lesión, post-cepillado, fueron sometidos a una biopsia que fue recogida en bloques de parafina. Para el grupo de control que se realizó cepillado del total de la cavidad oral.

Detección de VPH: ADN viral fue extraído por medio de la Kit comercial AccuPrep Genomic DNA Extraction (Bioneer Inc., CA, EE.UU.).

Un segmento de 450 pb, correspondiente a la región L1 del genoma viral, se amplificó por PCR, usando los cebadores consenso MY09 y MY11⁽²⁰⁾. El gen de β -globina se usó como un marcador de preselección del ADN⁽²¹⁾.

Las muestras positivas de ADN del VPH se genotipificaron por Análisis de los Polimorfismos de los Fragmentos de Restricción (RFLP) de acuerdo con Bernard et al., 1994.

Análisis estadístico: se utilizó la versión de software InfoStat 2011, con un nivel de significación del 5% (IC del 95%) (InfoStat, programa de ordenador 2011)⁽²⁴⁾.

Se realizaron pruebas de Chi-cuadrado (X^2) para determinar las posibles asociaciones entre la presencia, tipo y ubicación de las lesiones, clasifi-

cación citológica, hábito de fumar tabaco, consumo de alcohol, edad, género, VPH y otros factores de riesgo.

RESULTADOS

Los pacientes se clasificaron en cuatro grupos:

Grupo control: integrado por 30 personas, 8 varones y 22 mujeres, edad media: $41,8 \pm 17,1$ años (rango, 18-81). La mayoría de los controles no eran fumadores de tabaco y no bebedores (23/30 y 25/30, respectivamente).

Pacientes con lesiones benignas: 9 pacientes (1 mujer, 8 hombres), edad media $34,0 \pm 16,8$ años (rango, 18-58 años); 2 pacientes eran fumadores de tabaco, 2 informaron consumo de alcohol y 1 ambos hábitos.

Las localizaciones más frecuentes de las lesiones fueron la mucosa yugal ($n = 3$) y la lengua ($n = 3$), seguido de la úvula ($n = 1$), el paladar duro ($n = 1$) y la encía. La distribución por citología mostró: grado II ($n = 7$) y grado III ($n = 2$).

Pacientes con lesiones potencialmente malignas (PML): la media de edad de los 29 pacientes (16 mujeres, 13 varones) fue $52,6 \pm 14,7$ años (rango, 29-76 años). Cuatro pacientes eran fumadores de tabaco, 4 informaron consumo de alcohol regularmente y 3 ambos hábitos.

La localización de las lesiones más frecuente fue la lengua ($n = 18$), seguido de mucosa yugal ($n = 8$), el paladar duro ($n = 1$), piso de la boca ($n = 1$) y el labio ($n = 1$). Los resultados de la citología mostró: grado II ($n = 10$) y de grado III ($n = 19$).

Pacientes con neoplasia: La edad media de los 16 pacientes (8 mujeres, 8 varones) fue de $59,6 \pm 19,7$ años (rango, 23-89 años), 10 eran fumadores de tabaco; 7 informaron consumo de alcohol y 5 ambos hábitos.

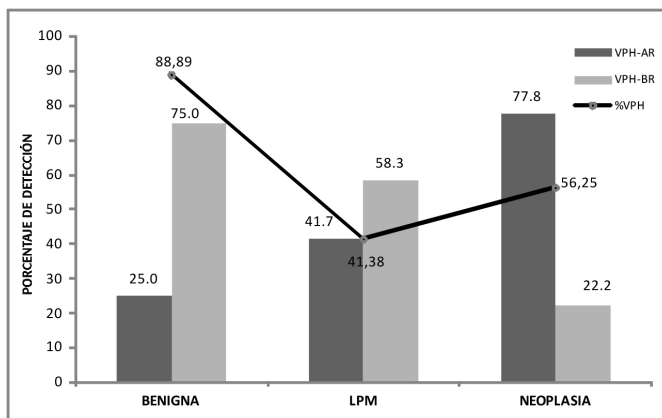
La localización de las lesiones más frecuente fue la lengua ($n = 8$), seguido de la mucosa yugal ($n = 3$), trigono retromolar ($n = 1$), labio ($n = 1$), encía ($n = 1$), el paladar duro ($n = 1$) y el piso de la boca ($n = 1$). La distribución en base a los hallazgos citológicos fue: grado III ($n = 7$), grado IV ($n = 3$) y el grado V ($n = 6$).

ADN-VPH se detectó en 88,89% (8/9) de las muestras de lesiones benignas orales, 41,38% (12/29) de las muestras PML orales y 56,25% (9/16) de las neoplasias orales. En las muestras de la grupo de control, no se detectó ADN-VPH.

Los genotipos más frecuente fueron genotipos 16 y 6. En conjun-

to, estos dos genotipos alcanzaron el 55% del número total de pacientes y ambos fueron detectados en los 3 grupos de pacientes.

La Figura 1 muestra el porcentaje de detección de VPH-AR y LR-VPH en los diferentes grupos.



Se halló una asociación significativa de la presencia de VPH con el hábito de fumar tabaco, consumo de alcohol y el género masculino, pero no se encontró asociación en pacientes mayores

50 años de edad. Con estos datos, se realizó un análisis estadístico entre las diferentes variables que incluyen el hallazgo de VPH, en comparación con el diagnóstico clínico e histopatológico demostrando asociación significativa entre la presencia de VPH y los pacientes con lesiones ($\beta = 24.61$, $p = 0,000$), lesiones benignas ($\beta = 5,38$, $p = 0,020$, OR = 9,14), citológico grado II ($\beta = 5,17$, $p = 0,023$, OR = 4,27) y la ubicación de la lesión en la mucosa bucal ($\beta = 4,70$, $p = 0,030$, OR = 4,48). Del mismo modo, se observó una asociación significativa entre los bebedores de alcohol con neoplasias ($\beta = 4,82$, $p = 0,028$, OR = 4,15) y con grados citológicos IV y V ($\beta = 5,86$, $p = 0,015$, OR = 5,78). El hábito de fumar tabaco mostró una asociación significativa con neoplasias ($\beta = 11,78$, $p = 0,001$, OR = 8,89) y con grados citológicos IV y V ($\beta = 12,01$, $p = 0,001$, OR = 14,00). Los hombres mostraron una asociación significativa con el hallazgo de lesiones ($\beta = 5,72$, $p = 0,017$, OR = 3,19) y con lesiones benignas ($\beta = 5,38$, $p = 0,020$, OR = 9,14). La edad no mostró asociación significativa con cualquier variable clínica histopatológica.

DISCUSIÓN

Comprender el papel del VPH en la carcinogénesis oral es difícil debido a las diferentes frecuencias de la infección por VPH en lesiones potencialmente malignas y en el cáncer oral^{(25,26]}. El porcentaje de detección de VPH en nuestro estudio fue similar a los datos reportados en otras publicaciones^{(27,28]}, del mismo modo, no se observaron diferencias significativas entre la detección de los diferentes genotipos, VPH-AR y VPH-BR. Sin embargo, podemos observar que los genotipos de alto riesgo se hallaron, principalmente en las lesiones malignas, mientras que los genotipos de bajo riesgo, fueron principalmente detectados en las lesiones benignas. Esto puede apreciarse en la Figura 1, donde se observa que los VPH-AR se detectaron en el 77,8% de los casos de neoplasia (VPH +), mientras que los VPH-BR se detectaron en sólo el 22,2% de los pacientes en este mismo grupo. Una situación inversa se observa en el grupo de pacientes con lesiones benignas, mostrando claramente que el VPH-AR se asocia con aumento de la gravedad de la lesión. Al igual que en publicaciones anteriores, el VPH-16 fue el genotipo VPH-AR más frecuente encontrado^{(29,30]} seguido por el VPH-52. Sin embargo a diferencia de otros estudios, el genotipo 18-VPH no se detectó en nuestro trabajo^{(30]} y tampoco hallamos asociación significativa entre la presencia del virus y la edad del paciente^{(5,31]}.

En discordancia con otros trabajos, donde se han reportado mayores tasas de detección de VPH en pacientes sin antecedentes de tabaco o el consumo de alcohol^{(32,33]}, nuestro estudio mostró que los pacientes que fumaban tabaco o consumían alcohol eran 3 veces más propensos a tener infecciones por el VPH (Tabla 2).

Como publicaran otros autores, la ubicación más frecuente de las lesiones, fue la lengua^{(27,35]} 53,7 % de los casos, seguido de la mucosa yugal 25,9 %. Las lesiones de la mucosa yugal presentaron asociación significativa con la detección del virus, que está de acuerdo con los datos reportados por otros autores sobre la base de la naturaleza epiteliotrópica del VPH^{(11,12]}.

Nuestros resultados mostraron que el consumo de tabaco y el consumo de alcohol tienen más influencia que el VPH en el desarrollo de lesiones neoplásicas. Sin embargo, el 56,2% de las neoplasias fueron positivos para VPH (Tabla 3), y el porcentaje de detección de VPH-AR aumenta con la gravedad de las lesiones, lo que sugiere la posible participación del virus en los procesos malignos (Figura 1). Tal vez, los VPH-AR no sean capaz de aumentar significativamente el riesgo de desarrollar lesiones malignas en

la cavidad oral por si solos, pero en presencia de otros factores tales como el tabaco y el alcohol, podrían jugar un papel importante en el desarrollo de estas lesiones. Muchos estudios han confirmado que el VPH es el agente causal del cáncer de cuello uterino, pero para determinar su rol en el cáncer oral, es necesario continuar con los estudios que permitan alcanzar mayores conclusiones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hirota SK, Migliari DA, Sugaya NN; 2006, Oral squamous cell carcinoma in a young patient - Case report and literature review. *An Bras Dermatol*; 81:251-4.
2. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA (2004): Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med* 33:525-32.
3. Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM (2005): Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med* 34:129-33.
4. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl. Cancer Inst* 92:709-20.
5. zur Hausen H. Papillomavirus and cancer (2002): from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342-50. S. M. Metev and V. P. Veiko, *Laser Assisted Microtechnology*, 2nd ed., R. M. Osgood, Jr., Ed. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1998
6. Castellsague X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, et al. (2004). The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 108:741-9
7. Farshadpour F, Hordijk GJ, Koole R, Slootweg PJ (2007) Non-smoking and non-drinking patients with head and neck squamous cell carcinoma: a distinct population. *Oral Dis* 13:239-43.
8. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J (1983) Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 12:418-24
9. Erdmann J (2003). Recent studies attempt to clarify relationship between oral cancer and human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst* 95:638-9
10. Nair S, Pillai M (2005) Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis* 11:350-9.
11. Bernard HU (2005) The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of the human papillomaviruses. *J Clin Virol* 32S:S1-S5
12. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 20;324(1):17-27.

13. Bosh FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244–65.
14. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518–27
15. Thompson IO, van der Bijl P, van Wyk CW, van Eyk AD (2001) A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium. *Arch Oral Biol* 46:1091–8.
16. Boy S, Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Dreyer L, van Heerden M, van Heerden W (2006). HPV detection in primary intraoral squamous cell carcinomas - commensal, a etiological agent or contamination? *J Oral Pathol Med*. 2006; 35:86-90.
17. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, et al (2012). Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009-2010. *JAMA* 307(7):693-703
18. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 36(10): 575-80
19. [Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al (2003). IARC Multicenter Oral Cancer Study Group: Human papillomavirus and oral cancer. The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *J Natl Cancer Inst* 95:1772-83
20. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, et al (1994). 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* 170:1077-85
21. De Roda Husman AM, Walboomers JM, Meijer CJ, Snijders PJ (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 39 ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76:1057-62
22. InfoStat[computer program] versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available from: <http://www.infostat.com.ar>
23. Yamada T, Manos M, Peto J, et al (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*, **71**, 2463-72.
24. Pande S, Jain N, Prusty B, et al (2008). Human Papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J Clin Microbiol*, **46**, 1060-6
25. Miller CS, White DK (1996) Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82:57–68.
26. Uobe K, Masuno K, Fang Y, Li LJ, Wen YM, Ueda Y, et al (2001) Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by in situ PCR. *Oral Oncol* 37:146–52.
27. Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, García-Cuellar CM, Guido-Jiménez M, Méndez-Martínez R, et al (2008). High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Arch Med Res* 39(2):189-97.

28. Tinoco JA, Silva AF, Oliveira CA, Rapoport A, Fava AS, Souza RP (2004). Human papillomavirus (HPV) infection and its relation with squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx. *Rev Assoc Med Bras* 50(3):252-6
29. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:467-75.
30. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, et al (2008). HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol* 19(10): 1681-90
31. Badaracco G, Venuti A, Morillo R, Muller A, Marcante ML (2000). Human papillomavirus in head and neck carcinomas: Prevalence, physical status and relationship with clinical / pathological parameters. *Anticancer Res* 20:1301-6
32. Hafkamp HC, Manni JJ and Speel EJ (2002). Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otorinol* 124:520-6.
33. Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT (2002). Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 6:3187-92.
34. Sócrates Aedo M, Pavlov SD, Clavero FC (2010). Riesgo relativo y Odds ratio ¿Qué son y cómo se interpretan? *Rev. Obstet. Ginecol* 5 (1):51-4
35. Falaki F, Dalirsani Z, Pakfetrat A, Falaki A, Saghravanian N, Nosratzahi T, et al (2011) Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: a retrospective study and review of literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 16(4):e473-71.

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is considered a necessary factor for the development of cervical cancer; however, its relationship with oral cancer is controversial. The aim of this study was detect the presence of HPV in lesions of the oral cavity and its correlation with other risk factors. Presence of HPV was studied by polymerase chain reaction in samples from benign lesions, potentially malignant lesions (PML), neoplasias and healthy mucosae. The results from the different groups were compared; in addition to their histopathological variables with tobacco smoking, alcohol consumption, so on. HPV was detected in 88.89% of benign lesions, 41.38% of PML and 56.25% of neoplasias. The most prevalent genotypes were 16 and 6. Together, reached 55% of the total number of cases. HPV 16 detected were mostly European variants. A significant association was observed between HPV and male gender, tobacco smokers, alcohol drinkers and benign lesions. Tobacco smoking and alcohol intake were

associated to neoplasias. Our results showed that factors like tobacco smoking and alcohol drinking, have more influence than HPV in the development of oral neoplasias; however, 56.2% of the neoplasias tested positive for HPV; the percentage of HR-HPV detection increased with the severity of the lesions, suggesting its possible involvement in malignant processes.







